
RECHERCHES SUR QUELQUES CASSIA AFRICAINS ET EN PARTICULIER
SUR LE CASSIA GORATENSIS FRES

=====

THESE

pour l'obtention du titre
de Docteur en Pharmacie de l'Université de Paris.
présentée et soutenue le 4 Juillet 1962

par

BAYHAN CUBUKÇU

Pharmacien de l'Université
d'Istanbul

MM. R. PARIS, Président

Jury : G. DILLEMANN, Professeur

P. DELAVEAU, Maître de Conférences.

RECHERCHES SUR QUELQUES CASSIA AFRICAINS ET EN PARTICULIER
SUR LE CASSIA GORATENSIS FRES

=====

THESE

pour l'obtention du titre
de Docteur en Pharmacie de l'Université de Paris.

présentée et soutenue le 4 Juillet 1962

par

BAYHAN ÇUBUKÇU

Pharmacien de l'Université
d'Istanbul

MM. R. PARIS, Président

Jury : G. DILLEMANN, Professeur

P. DELAVEAU, Maître de Conférences.

Mlle S. LAMBIN	Microbiologie (T)
MM. Y. RAOUL	Physiologie (T)
J. COURTOIS	Chimie biologique (T)
L. DOMANGE	Chimie minérale (T)
P. CRETE	Botanique (T)
R. TRUHAUT	Toxicologie et Hygiène industrielle (T)
A. MORETTE	Hydrologie (T)
R. CAVIER	Parasitologie (T)
A. QUEVAUVILLER	Hygiène et éducation sanitaire (T)
R. MOREAU	Pharmacie chimique (T)
J. GUY	Mathématiques appliquées aux sciences physiques et biologiques (T.P.)
A. GERMAN	Virologie et sérologie (T.P.)
M. PIETTE	Biologie sanguine (T.P.)
P. MALANGEAU	Chimie analytique (T)
M. GIRARD	Chimie appliquée à l'expertise (T)
G. DILLEMANN	Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie (T)
G. DEYSSON	Cytologie végétale (T.P.)
J. FLAHAUT	Minéralogie (T.P.)
C. BOUDENE	Professeur sans chaire
A. LE HIR	Professeur sans chaire
J. RENAULT	Professeur sans chaire

MAITRES DE CONFERENCES

MM. Y. COHEN	Sciences naturelles
P. LARUELLE	Physique
G. LE MOAN	Toxicologie
P. ROSSIGNOL	Pharmacodynamie

M. H. RENAULT	Pharmacie chimique
C. PAOLETTI	Sciences appliquées
A. MANGEOT	Chimie analytique
P. DELAVEAU	Matière médicale
P. REYNAUD	Sciences physico-chimiques
J. POISSON	Sciences naturelles
A. DESVIGNES	Microbiologie
F. PERCHERON	Biochimie
J. SAVEL	Sciences naturelles
J. BORY	Sciences naturelles

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

M. P. BINET	Parasitologie
P. GESTEAU	Physique biologique
J. GOUNELLE	Analyse appliquée au contrôle des Médicaments (Section biologie)
J. HARISPE	Chimie générale et pharmaceutique
J. HENRY	Chimie (4 ^{ème} année)
Mme J. HUBERT	Microbiologie
M. R. LELUC	Microbiologie
M. LEMONNEIR	Chimie analytique (2 ^{ème} et 3 ^{ème} année)
Mlle S. LONGUEVAALLE	Service des examens de chimie
M. F. PELLERIN	Chimie analytique (2 ^{ème} et 3 ^{ème} année)
R. PERLES (F.Fonc.)	Chimie biologique
J. PESTIS (F.Fonc.)	Biologie animale
R. POUILLAIN	Hématologie
J. RIVET (F.Fonc.)	Physique

me M. ROBERT	Sérologie
les A. ROLLEN	Biologie végétale
L. SEGUIN (F.Fonc.)	Analyse appliquée au Contrôle des Médicaments (Section physico-chi- mique)
me M. SEILLER (F.Fonc.)	Pharmacie galénique industrielle
M. J. YONGER (F.Fonc.)	Chimie analytique (I ^{ère} année)

INSTITUT DE PHARMACOTECHNIE ET DE PHARMACODYNAMIE

M. A. CAVE	Chef de travaux de pharmacotechnie galénique
lle H. MORIN	Chef de travaux de pharmacodynamie
M. ROBBA	Chef de travaux de pharmacotechnie chimique

BIBLIOTHEQUE

lle Y. RUYSSSEN	Conservateur, chargée de la Direction
lle LAVAUD	Conservateur
mes DESCRIPPES	Bibliothécaire
KREHMER	Bibliothécaire

A Monsieur le Professeur R. PARIS,
Professeur de Matière médicale à la Faculté de Pharmacie de Paris,
Chevalier de la Légion d'Honneur,

qui m'a fait l'honneur de me confier
le sujet de ce travail, de diriger mes
travaux et de présider le Jury de cette
Thèse

Témoignage de profonde et respectueuse gratitude.

A Monsieur le Professeur G. DILLEMANN

Professeur de Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie
à la Faculté de Paris,

qui a bien voulu s'intéresser à ce travail

Avec l'expression de ma profonde gratitude

A Monsieur P. DELAVEAU,

Maitre de conférences,

qui a accepté de juger ce travail

Avec l'expression de mes sentiments

reconnaissants

A LA MEMOIRE DE MON PERE

A LA MERE

A MON FRERE

Témoignage de ma profonde affection.

PLAN DU TRAVAIL.

Introduction

PREMIERE PARTIE: Etude botanique: p.12

- I.-Généralités sur les Cassia. p.12
- II.-Especies africaines étudiées p.14
- III.-Etude anatomique p.23

DEUXIEME PARTIE: Etude chimique: p.31

Chapitre I.-Travaux chimiques antérieurs sur les Cassia. p.31

Travaux personnels.

Chapitre II.- Techniques utilisées. p.45

Chapitre III.-Etude du Cassia goratensis Fres. p.56

A) Feuilles. p.56

- Essais préliminaires. p.56
- Etude du chromogène. p.61

B) Gousses.(péricarpes.) p.97

C) Graines. p.105

Chapitre IV. -Etude du Cassia arereh Del. p.111

Chapitre V. -Essais sur divers Cassia: p.121

- I.- Cassia acutifolia Del. p.122
- II.- Cassia auriculata L. p.124
- III.- Cassia italica (Mill.) Lam. (=C. obovata Coll.) p.128
- IV.- Cassia occidentalis L. p.129
- V.- Cassia sieberiana D.C. p.132
- VI.- Cassia tora L. p.134

CONCLUSIONS GENERALES. p.135

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE. p.140

INTRODUCTION

Les Cassia, Légumineuses Cesalpiniées répandues dans toutes les régions tropicales, comportent près de 800 espèces dont la plupart n'ont encore fait l'objet d'aucune investigation chimique. Pourtant ce genre fournit à la thérapeutique les Sénés officinaux, purgatifs anthracéniques qui sont parmi les drogues végétales les plus employées.

Plusieurs espèces de Cassia, en provenance du Cameroun et du Soudan, et dont certaines n'avaient jamais été examinées au point de vue chimique, étant parvenues au laboratoire de Matière médicale, mon Maître, le Professeur R. PARIS, m'en confia l'étude. Il pensait qu'en premier lieu, il était intéressant d'y rechercher les dérivés anthracéniques. Plusieurs publications du Professeur R. PARIS et de ses élèves, ont déjà porté sur ces substances: caractérisation et dosage dans les drogues officinales (Aloes, Bourdaine, Cascara, Nerprun, Rhubarbe et Sénés.), étude de la Casse, du suc frais de divers Aloes. Je devais accessoirement m'occuper d'autres substances polyphénoliques, tanins et flavonoïdes, assez abondants chez les légumineuses.

Avant d'entreprendre l'exposé de ce travail, je prie, mon Maître, le Professeur R. PARIS, de bien vouloir accepter, mes très sincères remerciements. Il m'a accueilli avec bienveillance dans son laboratoire, il dirigea mes recherches et me fit profiter de son érudition scientifique et de sa grande expérience du laboratoire. Qu'il veuille trouver ici l'expression de ma profonde et respectueuse reconnaissance.

Monsieur le Professeur G. DILLEMANN, et Monsieur P. DELAVEAU, Maître de conférences, ont bien voulu s'intéresser à ce travail et accepter de le juger. Je les assure de ma sincère gratitude.

Je ne saurais oublier que Madame MOYSE-MIGNON, assistante de la Chaire de Matière médicale, m'a aidée efficacement au cours de cette thèse et pour sa rédaction; qu'elle trouve ici l'expression de mes sentiments reconnaissants.

Monsieur A. STAMBOULI, Ingénieur de Recherches au C.N.R.S., m'a aimablement guidée dans différentes déterminations analytiques. Je l'en remercie vivement, ainsi que tous ceux qui m'ont amicalement aidée au cours de mon séjour au laboratoire; Monsieur A. DANGEARD aide technique, Madame R. POITOUX, Mademoiselle F. GOGLIN.

J'assure de mon amicale sympathie tous ceux auprès desquels j'ai travaillé pendant trois ans: Messieurs les Professeurs Agrégés G. FAUGERAS et P. FRIGOT, Monsieur J. P. THEALLET, assistant à la Faculté de Pharmacie de Paris, et mes camarades de Thèses au laboratoire: Madame M. BRALET-BASTIEN et Monsieur A. CHARLES.

Les échantillons des Cassia africains sur lesquels ont été effectuées ces recherches sont dus à l'obligeance de Monsieur R. LETOUZEY, Conservateur des Eaux et Forêts, de Monsieur P. REROLLE, Chef de la Section de Recherches forestières du Cameroun, et de Monsieur M. BAUER, Ingénieur des Eaux et Forêts, Chargé de Mission au Soudan. Je les remercie très vivement.

Plusieurs déterminations analytiques ont été effectuées dans le service du Professeur J. GUY, que je remercie ici.

PREMIERE PARTIE

Etude botanique

I - Généralités sur les Cassia

Le genre Cassia a été créé par LINNE en 1735, dans la première édition de son Genera plantarum. Ce genre appartient aux Légumineuses, sous-famille des Césalpiniées.

Celle-ci, à fleurs zygomorphes, est caractérisée par la préfloraison carénale de la corolle, les étamines libres en général, les ovules anatropes, les graines souvent albuminées à embryon droit.

La tribu des Cassiées a des sépales libres, des feuilles composées-pennées, des anthères à déhiscence généralement apicale.

Dans le genre Cassia, les fleurs ont 5 sépales libres imbriqués, 5 pétales alternes avec les sépales, presque égaux, 10 étamines en 2 verticilles, parfois 7 seulement fertiles et de taille inégale, des anthères déhiscentes par un pore ou une fente terminale, un ovaire pédonculé parfois. Le fruit est une gousse papyracée, coriace ou ligneuse, indéhiscente ou s'ouvrant le plus souvent par deux valves. L'intérieur est cloisonné ou non entre les graines. Celles-ci, nombreuses, sont disposées transversalement ou obliquement. Elles sont albuminées, les cotylédons sont plats ou parfois ondulés.

Le genre Cassia est répandu dans toutes les régions chaudes du globe. Il comprend aujourd'hui près de 800 espèces représentées par des arbres, des arbustes ou des herbes à

feuilles paripennées.

ENGLER et PRANTL (21) divisent le genre Cassia en trois sous-genres :

I - Fistula D.C. (= Cathartocarpus pers.)

Grands arbres, rarement arbrisseaux. Pétiole non glanduleux. Gousse indéhiscente et cylindrique, cloisonnée transversalement. Loges remplies d'une pulpe ou d'un tissu sec, renfermant chacune une graine. 10 étamines toutes fertiles, les 3 antérieures à filets plus allongés.

II - Senna (Roxb.) Benth.

Arbrisseaux ou herbes, rarement des arbres. Gousse généralement déhiscente, 5 sections.
-Pétiole non glanduleux ou avec glande entre les paires de pétioles:

1 . Chamaefistula D.C.. Gousse cylindrique incomplètement déhiscente, graines aplaties, disposées transversalement, 7 étamines fertiles.

2 . Prososperma Vog. . Gousse déhiscente, cylindrique, à 4 angles, graines allongées, 6 ou 7 étamines fertiles.

3 . Chamaesenna D.C. . Gousse déhiscente par 2 valves, aplatie souvent membraneuse, graines aplaties disposées parallèlement ou obliquement, 7 étamines fertiles.

-Pétiole avec glande basale:

4 . Oncolobium Vog. Graines transversales ou obliques.

5 . Psilorhegma Vog. . 10 étamines fertiles. Gousse aplatie, déhiscente par 2 valves. Graines disposées transversalement.

III - Lasiorhegma Vog.

Généralement 10 étamines fertiles. Gousse élastique à 2 valves. Anthères velues, barbues, 3 sections:

- 1 . Apoucuita Benth. Arbres à grappes de fleurs sur les branches.
- 2 . Absus Vog. . Arbres ou arbustes, grappes de fleurs terminales ou axillaires, plantes velues.
- 3 . Chamaecrista D.C. Fleurs isolées ou par 2-4, axillaires.

II - Espèces africaines étudiées.

Nous avons relevé dans l'Index Kewensis et ses suppléments 88 espèces africaines, surtout de la zone tropicale.

Parmi celles-ci nous avons étudié les espèces suivantes:

Cassia lacutifolia Del. (= C. senna L.) sous genre SENNA)

C. arereh Del. sous genre Fistula.

C. auriculata L. (espèce asiatique introduite au Cameroun)

sous genre Senna

C. goratensis Fres. (≠ C. singuana Del) sous genre Senna

C. italica (Mill.) Lam. (= C. obovata Coll.) sous genre Senna

C. occidentalis L. sous genre Senna

C. sieberiana D.C. (= C. Kotschyana Oliv.) sous genre Fistula

C. tora L. sous genre Senna

Nos recherches ont porté surtout sur C. arereh et C. goratensis, pour lesquels nous avons les échantillons les plus abondants et qui n'avaient pas encore fait l'objet de travaux chimiques.

-- Cassia acutifolia Delile (= C. Senna L.)

Cette espèce de la section Chamaesenna fournit l'un des Sénéés officinaux, le Séné dit de Khartoum ou d'Alexandrie ou d'Egypte. C'est un sous-arbrisseau glabre. Les feuilles ont 4 ou 6 paires de folioles, courtes, obovales, de 2 à 4 cm de long sur 1 à 1,5 de large, un peu asymétriques à la base, aiguës à l'extrémité. La gousse est oblongue, aplatie, de 4 à 5 cm de long sur 2 de large, le côté ventral est sensiblement rectiligne, le côté dorsal convexe. Il y a 6 à 7 graines.

Echantillons reçus :

- folioles récoltées au Soudan par M. BAUMER, en 1960

Lot A - aux confins du désert (16° lat. N. - 30° longit. Est)

Lot B - à EN NAHUD

Lot C - fruits, même origine.

Lot A

Les folioles ont 1,5 à 2,5 cm de long sur 0,5-1 cm de large, elles sont asymétriques à la base, aiguës à l'extrémité, d'une couleur jaune vert. La nervure médiane est déprimée sur la face supérieure, saillante sur la face inférieure.

Lot B

Les folioles ont les mêmes caractères, seulement moins grandes (1,2 - 2 cm de long sur 0,5 - 0,8 cm de large) et d'une couleur vert brunâtre. Elles sont plus minces.

Lot C

Les gousses sont aplaties, jaune brunâtre, brillantes,

déhiscentes longitudinalement. Le côté dorsal est convexe, le côté ventral rectiligne. Elles ont environ 4 cm de long et 2 cm de large.

Elles renferment 5 à 6 graines aplaties triangulaires pointues à la base, enchancrées dorsalement, disposées transversalement ou un peu obliquement, jaune verdâtre. Elles mesurent 6 mm de long, 3 mm de large et 1 mm d'épaisseur.

-- Cassia arereh Delile

Espèce décrite par Delile en 1826. C'est un arbuste ou un petit arbre, à l'écorce gris foncé, surtout répandu en Abyssinie et Erythrée, rare en Afrique occidentale, il se rencontre dans le Nord Cameroun (4). Il appartient au sous genre Fistula. Les feuilles qui atteignent 25 cm de long y compris le pétiole, ont 5 - 9 paires de folioles ovales elliptiques, longuement pétiolées, en coin à la base, aiguës ou légèrement acuminées à l'extrémité. Elles ont généralement de 3 à 4,5 cm de long (jusqu'à 7,5 cm) et de 1 à 2,5 cm de large (jusqu'à 3,5 cm). (3) (45)

Les inflorescences sont en corymbes terminaux de 15 cm de long, avec des bractées persistantes lancéolées, linéaires, acuminées, les fleurs jaunes longuement pédicellées, très odorantes, s'épanouissent en février.

Le fruit est une gousse cylindrique de 35 cm de long, pendante, brune, se fendant latéralement à maturité.

Echantillons reçus :

Nous avons disposé de folioles, de gousses et de graines de cette espèce, récoltées dans le Nord Cameroun en juin 1959

par les services forestiers du Cameroun (M. REROLLE) .

Folioles : gris verdâtre, 4 - 7,5 cm de long sur 1,5-5,5 cm de large, ovales elliptiques, pointues à l'apex et à la base. La nervation réticulée est très apparente, la nervure médiane est saillante surtout à la face inférieure.

Gousses : brun rougeâtre, très dures, cylindriques un peu aplaties, elles mesurent environ 60 cm de long sur 3 - 3,5 de diamètre . Elles sont cloisonnées transversalement à des intervalles de 6 à 7 mm, chaque loge comportant une graine. La pulpe qui entoure les graines, qui d'après AUBREVILLE (4) serait employée comme laxative a été détériorée par des parasites dans l'échantillon reçu .

Graines : brun rougeâtre, aplaties, presque rondes, déprimées au milieu sur les deux faces, de 3 mm de long sur 7 mm de large.

-- Cassia auriculata L.

Cette espèce, de la section de Chamaesenna, est un arbrisseau commun dans les régions les plus sèches de la péninsule indienne (4) . Il est connu sous le nom de Séné Palthé.

L'écorce est de grande valeur tannante (15 à 20 % de tanin) (4) . Les folioles, oblongues à obovées, de 8 à 30 mm de long sur 4 à 15 mm de large, sont minces, à pointe émoussée ou mucronée, à base inégale. Fleurs à 7 étamines fertiles, anthères s'ouvrant par un pore apical. Gousse plate déhiscente, graines transversales.

Cette espèce étudiée en tant que falsification des Séné

officinaux est décrite en particulier par THOMS (87), FORSDIKE (29), HOLTZEM (44) .

Echantillons reçus :

Folioles et gousses récoltées au Nord Cameroun (où cette espèce est introduite pour le reboisement) par les services forestiers, en juin et novembre 1959 .

Folioles : jaune vert, de 1 à 2,2 cm de long sur 0,5 - 1 cm de large, ovales, mucronées à l'apex, asymétriques à la base. La nervure médiane est saillante sur la face inférieure.

Gousses : plates, 9 à 10 cm de long sur 1,2 à 1,7 cm de large, d'une couleur brun rougeâtre. Les graines sont disposées transversalement, elles sont aplaties, brunes, de 0,7 cm de long sur 0,5 de large.

-- Cassia goratensis Fres. (= C. singueana Del.)

Espèce décrite en Abyssinie par FRESENIUS en 1839, rangée d'après ENGLER dans le sous-genre Senna, section Chamae-fistula. Arbuste ou arbre atteignant 9 m., répandu d'après AUBREVILLE dans toute la zone soudanaise, au Cameroun, Oubangui, en Afrique orientale (Ouganda, Kenya, Abyssinie, Erythrée) et australe. Il existe dans l'Angola, la Rhodésie, le Katanga et le Nyassaland.

L'écorce est grise, parfois presque blanche, fissurée.

Les feuilles qui atteignent 26 cm y compris le pétiole ont 7 à 12 paires de folioles oblongues, elliptiques, de 2,5 à 5 cm de long et 0,8 à 2,5 cm de large, légèrement émarginées ou mucronées. Il existe des glandes interpétiolaires. (3) (45)

Les fleurs , en grappes corymbiformes à l'extrémité des

branches, sont d'un jaune éclatant, elles s'épanouissent de septembre à janvier (4)

Les gousses sont jaunes, puis noires et collantes à maturité, elles ont de 7 à 20 cm de long sur 0,6 à 1,6 cm de large, sont rétrécies entre les graines, en bec à l'apex .

Echantillons reçus :

Nous avons disposé de folioles, de gousses et de graines, provenant du Nord Cameroun (région de Mokole) et envoyés en 1959 par M.R.LETOUZLEY, Conservateur des Eaux et Forêts de la France Outre-Mer .

Les folioles ont 1,7 à 4,5 cm de long et 0,7 à 2 cm de large. Elles sont jaune verdâtre à la face supérieure et plus pâles à la face inférieure, elliptiques émarginées ou à pointe mousse, légèrement asymétriques à la base.

La nervure médiane est légèrement déprimée sur la face supérieure et saillante sur la face inférieure. Les nervures secondaires se détachent sous un angle de 60° et s'anastomosent sur le bord du limbe . Les folioles ont une saveur astringente.

Les gousses sont d'un noir brillant, fermes, collantes en raison de la pulpe sucrée qui exsude, cylindriques avec deux lignes de suture. Elles mesurent 12 - 14 cm de long sur 0,7 - 1 cm de large, sont légèrement rétrécies entre les graines. Elles sont cloisonnées transversalement, chaque loge renferme une graine aplatie disposée transversalement, de 0,6 de long sur 0,4 cm de large, brune à l'extérieur, jaune vif à l'intérieur, d'une saveur légèrement amère .

La pulpe sucrée au début, devient très amère après mastication.

-- Cassia obovata Colladon (= C. italica (Mill.) Lam.)
(=Senna italica Mill.)

Espèce appartient à la section Chamaesenna . Elle a été officinale en France, aux éditions de 1937 et 1949 de la Pharmacopée mais sera supprimée dans la 8^e édition.

Sous-arbrisseau, feuilles de 3 à 7 paires de folioles courtes, ovales, nettement asymétriques à la base, obtuses et parfois mucronées au sommet, atteignant 3,5 cm de long sur 2 à 2,8 de large.

Les gousses sont aplaties, fortement arquées, réniformes et renferment 8 à 10 graines. Il existe une crête saillante ondulée sur chaque face au dessus de la graine.

Echantillons reçus :

Folioles, récoltées par M. BAUMER, près de EN NAHUD, Soudan, en septembre 1960 .

Les folioles de 2 à 3 cm de long sur 1 à 1,5 cm de large, sont obovées, pointues à l'extrémité, asymétriques à la base.

-- Cassia occidentalis L.

Espèce de la section Oncolobium, très répandue dans les régions tropicales et notamment en Afrique.

Herbe ou sous arbrisseau atteignant 1,5 m de haut, ligneux à la base. Inflorescences axillaires à peu de fleurs; 6-7 étamines fertiles s'ouvrant par des pores à la pointe .

Feuilles à 4 - 5 paires de folioles lancéolées, de 3,5 à 10 cm de long sur 2 - 4 cm de large, celles du sommet sont plus grandes, aiguës ou acuminées à l'apex .

Gousse aplatie, légèrement déprimée entre les graines, atteignant 12 cm de long.

Echantillons reçus :

Folioles et gousses récoltées au Soudan (région de EN NAHUD) par M. BAUMER en 1960.

Les folioles , cassées en petits morceaux, n'ont pu être reconstituées .

Les gousses , aplaties, de 11 - 12 cm de long, 7 cm de large, légèrement déprimées entre les graines, ont deux lignes de suture . Elles sont cloisonnées transversalement à des intervalles de 2 mm, elles renferment de nombreuses graines, une dans chaque loge .

Les graines sont brunes, grossièrement ovoïdes, très ridées et mesurent 4 mm de long sur 2 mm de large .

-- Cassia sieberiana D.C. (= C. Kotschyana Oliv .)

Espèce décrite par De CANDOLLE, en 1824, appartient au sous-genre Fistula. Arbre atteignant 7,5 m.

Il est répandu en Afrique tropicale : Casamance, Soudan, Ouganda.

L'écorce est noirâtre, rugueuse, à cassure jaune, le bois rouge pâle est très dur (4)

Feuilles de 30 cm, à 6-14 paires de folioles oblongues, ovées, elliptiques, obtuses ou subaiguës au sommet, mesurant 3,5 à 8,5 cm de long sur 1,8 à 4,3 cm de large. Les paires de follicules de la base sont aussi longues que larges, celles de l'extrémité deux fois plus longues . Le limbe est un peu brillant en dessus, mat dessous. (3) (45) Les bractées sont linéaires, lancéolées . Les

fleurs sont jaune pâle, en panicules terminales, retombantes.

Les gousses sont pendantes, noires, cylindriques, très allongées (jusqu'à 90 cm de long) sur 1 à 1,5 cm de diamètre. Indéhiscences, elles sont cloisonnées transversalement et renferment de nombreuses graines.

Echantillons reçus :

Folioles, gousses et graines récoltées dans le Nord du Cameroun, région de Mokole, en 1959, et envoyées par M. R. LETOUZEY, Conservateur des Eaux et Forêts de la France Outre-Mer.

Folioles : ovées à ovées elliptiques, 5 - 6 cm de long sur 2 - 2,5 cm de large, brun verdâtre, brillantes au dessus, mates et pubescentes au dessous . Nervures secondaires réticulées peu saillantes. La nervure médiane est déprimée à la face supérieure, saillante à la face inférieure.

Gousses . Nous les avons reçues en morceaux cylindriques de 1,5 cm de diamètre, brun noir à l'extérieur, jaunâtre à l'intérieur, cloisonnées transversalement . La saveur est un peu âcre et astringente . Les graines, marron clair, aplaties ont 1 cm de long sur 0,6 cm de large, elles sont brillantes et dures .

-- Cassia tora L.

Arbrisseau des régions tropicales, appartenant à la section Prosoesperma . Il peut atteindre 1,20 m à 1,80 . Les feuilles, y compris le pétiole, atteignent 15 cm, elles ont 2 à 3 paires de folioles obovées, mucronées à la pointe, ayant jusqu'à 6 cm de long et 3 cm de large .

Les fleurs, axillaires, sont solitaires ou par paires.

Les gousses, étroites, de 3 à 6 mm de diamètre sont allongées, elles ont jusqu'à 15 - 20 cm de long. Les graines y sont rangées longitudinalement (45) .

Echantillons reçus :

Folioles récoltées à EN NAHUD, Soudan, par M. BAUMER, en octobre 1960 . Parvenues en petits fragments, nous n'avons pu les reconstituer .

III - Etude anatomique

Des coupes transversales des folioles des différentes espèces examinées ont été effectuées, dans le but de les comparer à celles des folioles des Sénés officinaux : Cassia angustifolia et C. acutifolia .

Celles-ci sont caractérisées par un mésophylle hétérogène symétrique, avec une assise de tissu palissadique sous les deux épidermes .

La nervure médiane est biconvexe, le système libéro-ligneux est entouré de fibres péricycliques accompagnées de tubes cristalligènes . Il existe sur les deux épidermes, non papilleux des poils tecteurs unicellulaires, coniques, renflés à la base un peu arqués, à paroi épaisse et ponctuée

Cassia obovata : a des caractères voisins mais l'épiderme inférieur est papilleux (FAMILI et CHARTIER -62-) .

En ce qui concerne C. auriculata, les caractères anatomiques des folioles ont déjà été étudiés par FORSLINE (29), HOLTZEM (44) qui ont signalé le mésophylle asymétrique avec deux assises de tissu palissadique à la face supérieure, se continuant au niveau de la nervure et l'existence de poils tecteurs nombreux, à parois lisses, 3 fois plus longs que chez Cassia angustifolia (fig. 1 et fig. 3)

Les différentes espèces africaines étudiées présentent des caractères communs avec les Sénés officinaux : dans la nervure, un seul arc libéro-ligneux entouré de fibres péricycliques accompagnées de tubes cristalligènes.

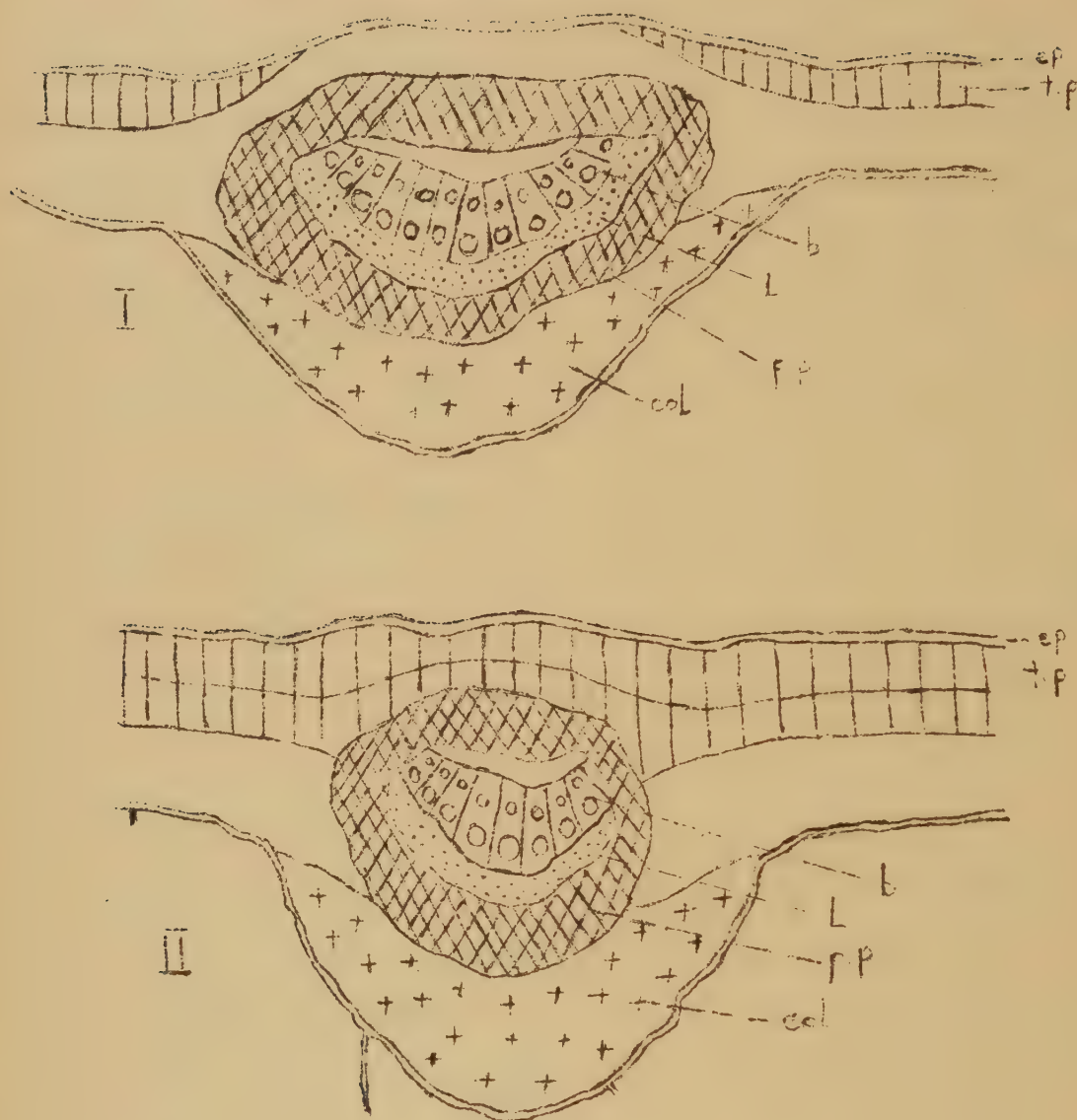


fig. 1 - Coupe transversale schématique de la feuille :

I)- Cassia arereh

II)- Cassia auriculata

ep. = épiderme supérieur,
 t.p. = tissu palissadique,
 b. = bois,
 l. = liber,
 f.p. = fibres péricycliques,
 col. = collenchyme.

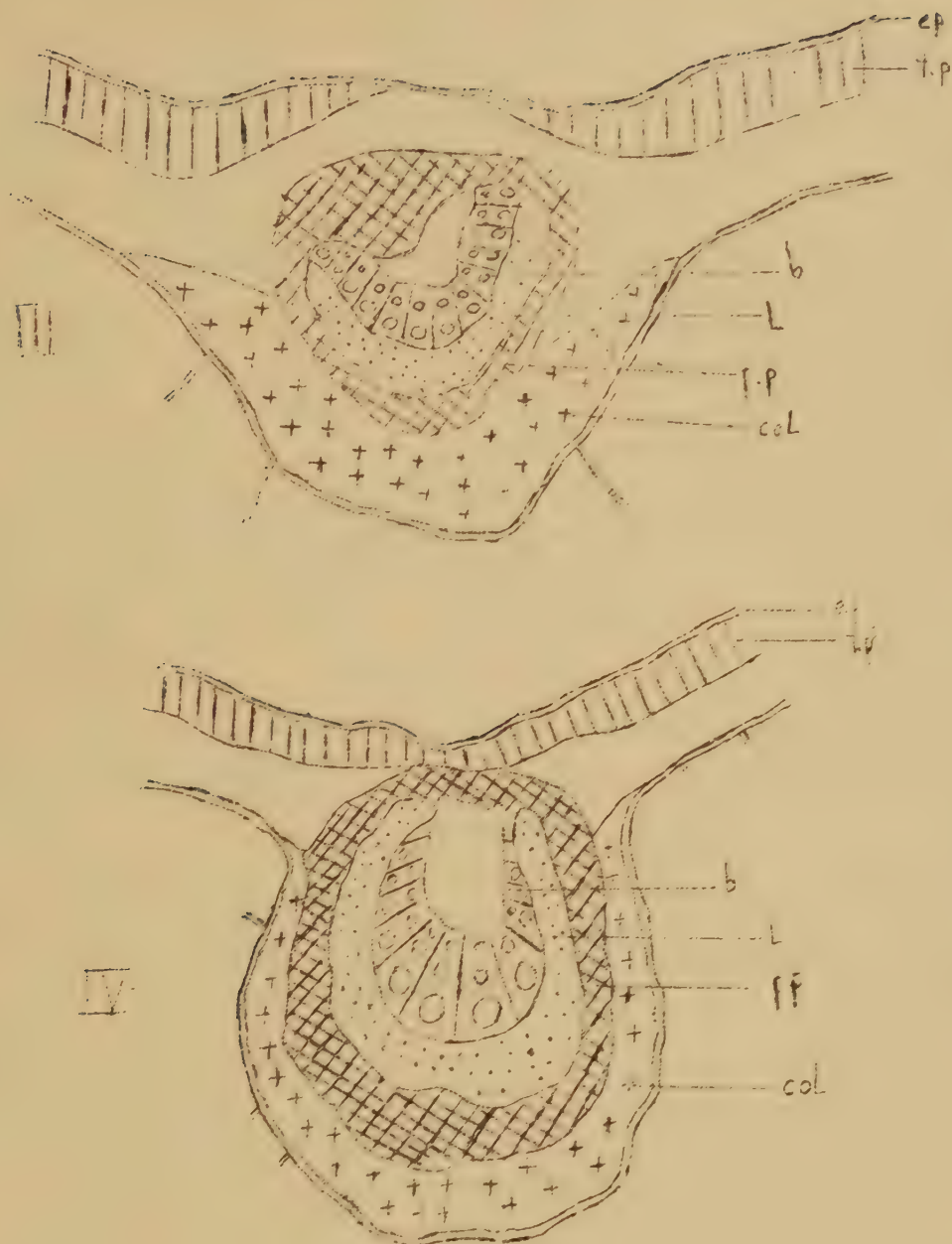


fig. 2 - Coupe transversale schématique
de la feuille :

III)- Cassia goratensis

IV)- Cassia sieberiana

ep. = épiderme supérieur
t.p. = tissu palissadique
b. = bois

l. = liber
f.p. = fibres péricycliques
col. = collenchyme

Nous signalerons dans le tableau ci-dessous les caractères particuliers :

Espèces	nervure	épidermes	mésophylle
<u>Cassia arereh</u> (fig.1)	: assez saillante sur la face inférieure	: glabres	: asymétrique, une assise de tissu palissadique
<u>Cassia goratensis</u> (fig.2)	: saillante sur la face inférieure	: Inférieur papilleux, longs poils unicellulaires, courbes, sur les deux faces	: asymétrique, une assise de tissu palissadique
<u>Cassia sieberiana</u> (fig.2)	: très saillante sur la face inférieure	: épiderme inférieur très papilleux nombreux poils courts sur la face inférieure	: asymétrique, une assise de tissu palissadique

Il ne nous est pas possible de faire des coupes de folioles de C. occidentalis L. et C. tora, les échantillons étant arrivés en petits fragments . Par contre, tous les échantillons ont été examinés, après éclaircissement au lactophénol, pour observer les caractères des épidermes et des poils .

Cassia arereh: épidermes glabres à cuticule mince, pas de stomates sur la face supérieure, stomates entourés de 2 cellules annexes sur la face inférieure (fig. 3) .

Cassia auriculata: poils tecteurs, à paroi lisse, sur les deux faces de 250 à 350 μ de long en général et pouvant atteindre 500 μ (fig.3)

Cassia goratensis: épiderme inférieur, nettement papilleux, poils tecteurs sur les deux faces, unicellulaires, à parois légèrement verruqueuse, arqués, de 260 à 660 μ de long en général

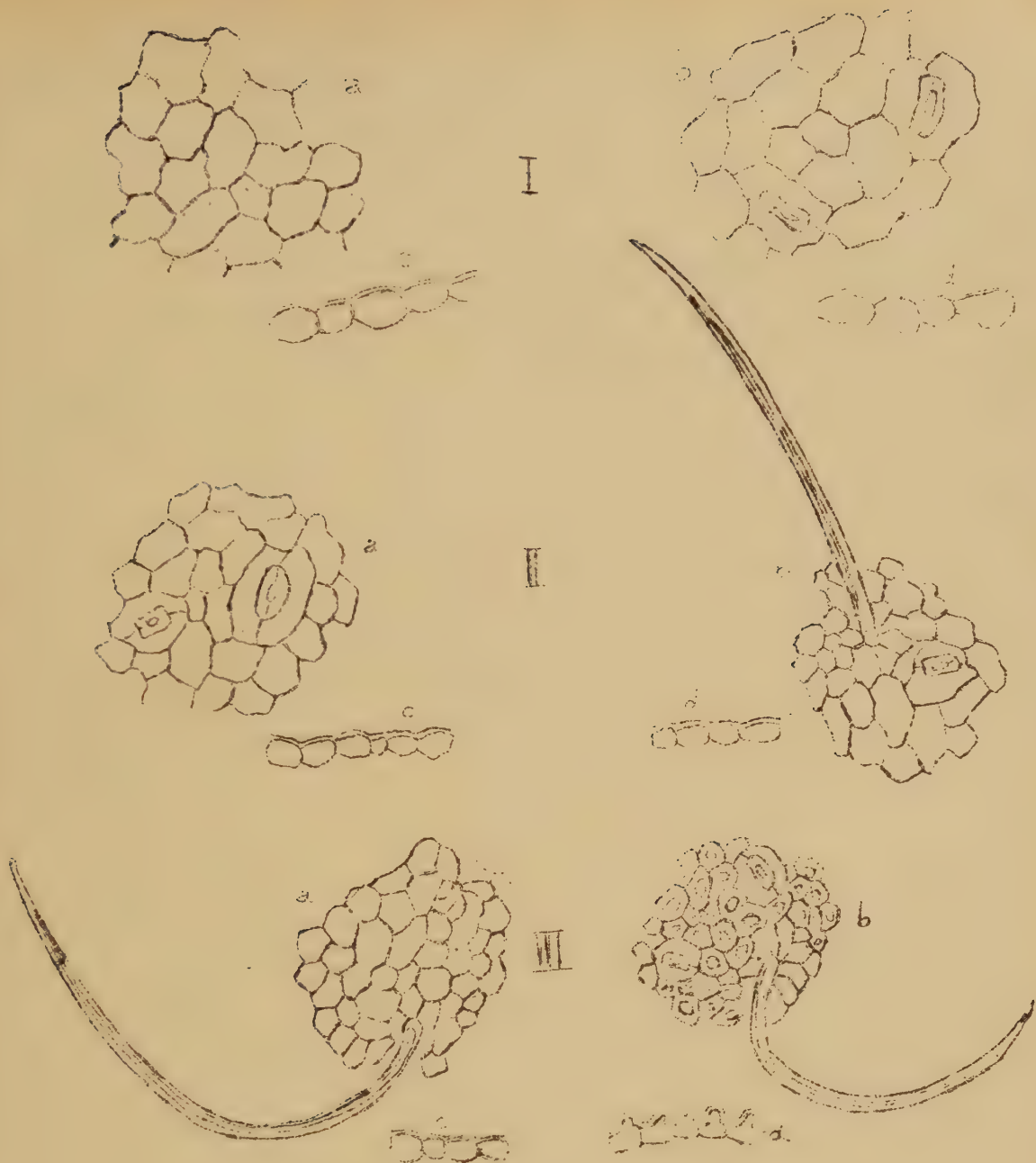


fig. 3

I : Cassia arereh II : Cassia auriculata III : Cassia goratensis

a - Épiderme supérieur de la feuille vue de face

b - Épiderme inférieur de la feuille vue de face

c - Cellules de l'épiderme supérieur en coupe trans-
versale

d - Cellules de l'épiderme inférieur en coupe trans-
versale

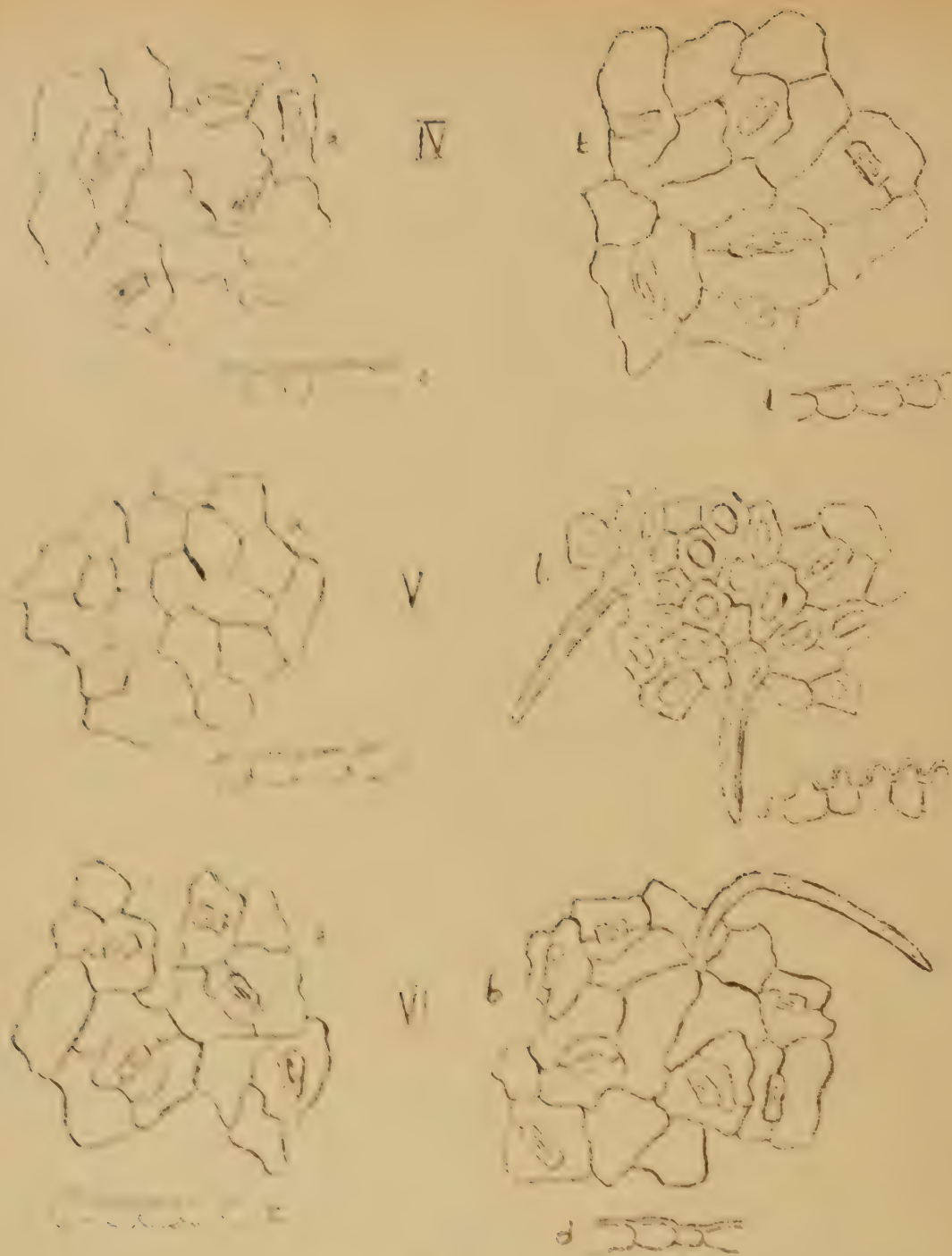


Fig. 4

- IV : *Cassia occidentalis* V : *Cassia sieboriana* VI : *Cassia tora*
 a - Epiderme supérieur de la feuille vue de face
 b - Epiderme inférieur de la feuille vue de face
 c - Cellules de l'épiderme supérieur en coupe transversale
 d - Cellules de l'épiderme inférieur en coupe transversale

et atteignant 850 μ .

Stomates sur la face inférieure seulement, deux cellules annexes dont une plus grande (fig. 3)

Cassia occidentalis: épiderme glabre, stomates sur les deux épidermes, très nombreux, à deux cellules annexes . (fig. 4)

Cassia sieberiana: stomates seulement sur la face inférieure, épiderme supérieur glabre à cuticule épaisse, épiderme inférieur nettement papilleux, poils courts, nombreux, à parois ponctuées, couchés sur l'épiderme, de 140 μ de long en moyenne, pouvant atteindre 400 μ (fig. 4)

Cassia tora: stomates sur les deux faces avec deux cellules annexes, poils rares, courts (120 à 230 μ), sur la face inférieure, à parois épaisses, ponctués .(fig.4)

DEUXIEME PARTIE

ETUDE CHIMIQUE

Chapitre ITravaux chimiques antérieurs .

Sur près de 800 espèces de Cassia décrites jusqu'à ce jour, 31 seulement ont fait l'objet de quelques recherches chimiques . Celles-ci ont abouti principalement à la caractérisation de dérivés anthracéniques .

La répartition de ces substances dans le genre Cassia a été étudiée d'abord par GILG et HEINEMANN en 1926 (39) puis récemment par HEGNAUER (43) . Elles semblent présentes dans toutes les sections du genre . Divers auteurs ont effectué la recherche des dérivés anthracéniques dans différents Cassia et les ont dosé colorimétriquement: MAURIN (56) (57), ABIUSSO (1) DUQUENOIS (17) .

Plusieurs se sont préoccupés des méthodes de dosage dans les espèces officinales (MAURIN (56), KUSSMAUL (54), FAIRBAIRN et ses collaborateurs (25), AUTERHOFF (5), NEUBERN DE TOLEDO (89), PARIS et DAVID-CUNY (64), KARTNIG (51) .

Les premiers hétérosides obtenus à l'état cristallisé sont les semmosides A et B isolés par STOLL et coll. (83) en 1949 à partir des folioles de Cassia angustifolia et dont la constitution est bien établie . En 1951 FAIRBAIRN et SALEH (27) soupçonnent l'existence d'un hétéroside non rhénique chez les Sénés officinaux . FAIRBAIRN et coll. (23) isolent en 1958 un glucoside primaire (poids moléculaire 1164) .

Des hétérosides voisins ont été séparés plus récemment des gousses du Cassia acutifolia . Le rhéine-monoglucoside a été

isolé par VICKERS en 1961 (96) . La substance obtenue peu après CRELLIN et FAIRBAIRN (14), rhéine 8 glucoside, paraît très voisine.

CRELLIN et FAIRBAIRN ont isolé en outre des gousses du Cassia acutifolia une rhéine-8-diglucoside, la rhéine anthrone-8-glucoside et un glucoside primaire de poids moléculaire 2.000, donc supérieur à celui du glucoside caractérisé par FAIRBAIRN en 1958 . Des feuilles a été isolé l'aloë-émodyne glucoside déjà entrevu par TUTIN en 1913 (94) .

Des gènes anthracéniques ont été obtenues à partir de 9 espèces, certaines ont été séparées à l'état pur en petite quantité (rhéine, aloë-émodyne, ~~aloïne~~, ~~barbaloine~~, émodyne, chrysophanol, physcion, obtusifoline, anthrone de l'acide chrysophanique) mais le plus souvent elles ont été simplement caractérisées en chromatographie sur papier avec différents solvants : cyclohexane saturé de méthanol (92), toluène, ou toluène saturé d'eau (10), pyridine, eau, benzène (1 - 3 - 1) (50) ; éther de pétrole, toluène, xylène, méthanol (4- 1 - 1 - 1) (77) .

Un système eau-acétone-benzène (2 - 1 - 4) a été préconisé par BETTS - FAIRBAIRN et MITAL (10) pour la séparation des glucosides anthracéniques des Sénécs, mais celle-ci n'est satisfaisante qu'avec les produits purs.

Cette méthode a été améliorée par SABER et coll. (76) utilisant un papier imprégné de bicarbonate de sodium pour caractériser les glucosides du Cassia obovata .

BORKOWSKI et coll. (11) utilisent le butanol acétique de PARTRIDGE par la méthode descendante, KAPADIA (47) le même solvant en chromatographie circulaire pour la caractérisation des sennosides.

En dehors de dérivés anthracéniques, des tanins et des dérivés flavoniques ont été mis en évidence dans un certain nombre d'espèces .

Dans les tableaux suivants nous avons rassemblé les données actuelles de la littérature, concernant la composition chimique des Cassia et notamment les dérivés anthracéniques; les substances seulement caractérisées en chromatographie sont marquées d'un astérisque .

Dérivés anthracéniques		Autres substances
Teneur %	Substances isolées ou caractérisées par chromatographie sur papier (✱)	
Feuilles:	<u>C. acutifolia</u> Del. (Séné d'Alexandrie)	
1,55g (56)	:Rhéine (lib. et gluc. amorphe) (94)	Kaempférol (lib. et gluc. amorphe) (94)
1,25g (tige) (57)	:Aloe émodine (lib. et gluc.) amorphe (94)	Isorhamnétine (94)
0,90g (dér. lib.) (20)	:Sennosides A et B (83)	Phytostérol (94)
2,48-3,32g (dér. tot.) (27)	: "Non-Rhein Glucoside" (27)	Alcool myricyclique (94)
	: Aloe émodine (lib. et gluc.) (✱) (11) (92) (91)	
3,25g (51)	:Rhéine anthrone lib. et gluc. (✱) (91)	
3,09g (11)	: Aloe émodine anthrone (lib. et gluc.) (✱) (91)	
	: Rhéine (lib. et gluc.) (✱) (92) (91)	
	: Chrysophanol et chrysophanol-anthrone (✱) (11)	

:Sennidine ou rhéine (※) (11)

:Aloe émodine gluc. (14)

Gousses :

1,45g (56) : "Non-rhein glucoside" (27)

2,6-3,92g (27) : Rhéine monogluc. (96)

4,75g (51) : Rhéine 8-glucoside (14)

: Rhéine 8-glucoside (14)

: Rhéine-anthrone 8-glucoside (14)

: Glucoside primaire (14)

C. alata L.

Feuilles: : Rhéine (42)

Activité biologique : Substance F = 140-150° (42)

égale à celle

des Sé-

nés offici-

naux (88) : Aloe émodine anthrone lib. (※) (91)

: Rhéine lib. et gluc. (※) (91)

Riche en

anthraqui- : Rhéine anthrone gluc. (※) (91)

none et

oside (17)

Gousses :

2,20g (57)

Substance :

$C_{15}H_8O_7$

F = 335-336° (42)

Dérivés anthracéniques		autres substances
Teneur %	Substances isolées ou caractérisées par chromatographie sur papier (*)	
<u>C. angustifolia</u> Vahl. (= Séné de Tinnevely)		
Feuilles:		
1,35 (56)	Rhéine lib. et gluc. amorphe (94)	pinitol (16-bis)
0,78 dér. lib. en émodine (20)	Aloe émodine (94)	kaempférol (94)
3,63 (dér. tot.) (5)	Deux anthranols-gluc. (82)	kaempférine (94)
2,24-3,78 (dér. tot.) (27)	Sennosides A et B (83)	alcool myricyclique (94)
3-4 (64)	"Non-rhein glucoside" (27)	alc. salicylique(94)
4,70 (51)	Aloe émodine lib. et gluc. (*) (11) (92) (91)	acide palmitique(94)
3,26 (11)	Rhéine lib. et gluc. (*) (92)(91)	acide stéarique (94)
	Chrysophanol et chrysophanol an-throne (*) (11)	
Graines:		P-sitostérol 0,033% (13)
Gousses:		
1,30 (56)	"Non-Rhein Glucoside" (27)	
3,55 (5)	Glucoside primaire (P.M. 1164)(23)	
2,62-2,81 (27)		
4,15 (51)		

C. aphylla Cav.

Fleurs	1,23g	:
Fruits	0,98	:
Ramoux	0,99-1,04g	:
Ecorce	0,66g	:
Tronc	0,87g	:
Racine	0,88g	:

(1)

C. arlindo - Andradei Hoehne

Feuilles	:
R. BORNTRAGER	:
positive (90)	:

C. arnottiana Hook. et Arn.

Feuilles	1,49g	:
Fleurs	1,56g	:
Gousses	2,44g	:
Graines	3,36g	:
Pédoncules	:	:
et rachis	1,80g	:
Ecorce	4,56g	:
Tronc	2,64g	:
Racine	2,88g	:

(1)

Teneur %	Dérivés anthracéniques	Autres substances
	Substances isolées ou caractérisées en chromatographie sur papier (*)	
	<u>C. auriculata L.</u>	
Feuilles:	:	:
0,70g (57)	:	substance donnant une coloration rouge avec H ₂ SO ₄ à 80% (95) (non isolée)
Ecorce de tige	:	:
1,90g (57)	:	:
Graines	:	β sitostérol (13)
	<u>C. bicapsularis L.</u>	
Feuilles 0,89g	:	:
Fleurs 1,40g	:	:
Bractées 0,28g	:	:
(1)	:	:
	<u>C. carnaval Speg.</u>	
Feuilles 0,33g	:	:
Fleurs 0,32-0,49g	:	:
Graines traces	:	:
Gousses 0,09g	:	:
Pédoncules	:	:
et rachis 0,15g	:	:
(1)	:	:
	<u>C. corymbosa Lam.</u>	
Feuilles 0,94g	:	:
Fleurs 1,50g	:	:
Graines 1,06g	:	:
Gousses 0,94g	:	:
(1)	:	:

	Dérivés anthracéniques	Autres substances
Teneur%	Substances isolées ou caracté- risées en chromatographie sur papier (x)	

C. fistula L.

La pulpe :		
1,05g (57)	Aloïne et Barbaloïne (48)	Huile essentielle (58)
0,30-0,36g (19)	Rhéine (58) (19)	3 subst. cireuses (58)
	Substance F= 250° (58)	F = 52-53° 64-68° 114-116°
	Aloe-émodyne lib. et combinée (x) (92) (91)	
	Chrysophanol ou physcion (lib. et combiné) (x) (92) (91)	
	Rhéine glucoside (x) (92)	

Graines :		
	Anthrone de l'ac. chrysophanique (x) (49)	mat. grasses 3g % (ac. palmitique, lignocérique, oléique, linoléique) (28)
	Chrysophanol (ou physcion) lib. et gluc. (x) (92) (91)	B-sitostérol 0,005g % (13)

Ecorce de tige
1,20g (57)

C. glauca Lam.

Fruits 0,15g (57)	
Feuilles	Glucoside chrysophanol (40)
Graines	Gluc. chrysoph. (40)

Dérivés anthracéniques		Autres substances
Teneur %	Substances isolées ou caractérisées en chromatographie sur papier (*)	
<u>C. Jahnii</u> Rose		
Feuilles	0,90g :	
Fleurs	0,94g :	
Gousses	0,87g :	
Graines	2,06g :	
	: (79)	
<u>C. javanica</u> L.		
Fruits	:	
0,16g	: (57)	
<u>C. leptophylla</u> Vog.		
Feuilles:	:	
Activité biologique:		
moitié de celle du Séné		
	: (90)	
<u>C. laevigata</u> Wild.		
0,10g(fruits)	:	β sitostérol (13)
(57)	:	(graines)
1,9g(feuilles)	:	
(17)	:	
<u>C. marylandica</u> L.		
Feuilles	0,65g :	
(57)	: chrysophanol (78)	
<u>C. mimosoides</u> L.		
Fruits	0,10g(17)	
<u>C. nigricans</u> Vahl.		
0,45-1,43g	:	
(Fruits, tige	:	
feuilles)	:	
(17)	:	

Teneur %	Dérivés anthracéniques	Autres substances
	Substances isolées ou caractérisées en chromatographie sur papier (*)	
<u>C. obovata Colla.</u>		
Feuilles	:	:
1,10g (57)	: Rhéine (*)	:
	: Aloe émodine (*)	:
	: Aloe émodine-anthranol (*)	:
0,86-1,35g (76)	: Chrysophanol traces (*)	:
	: Sennidine (*)	:
	: Sennosides (*)	:
	: Glucoside non rhéinique (*) (76)	:
<u>C. occidentalis L.</u>		
Feuilles	:	:
Traces (57)	: Rhéine (59)	:
0,8-2,7g(1)	: Chrysophanol (59)	:
Traces (17)	: Substance avec les caractéristiques d'une 1-8-dihydroxyanthraquinone (59)	:
Fleurs	:	:
0,79g (1)	: Chrysophanol (ou physcion) lib. et comb. (*) (92) (91)	:
Tige	:	:
1,4-2g (1)	:	:
Fruits	:	:
0,25g (57)	:	:
3,87g (1)	:	:
Traces (17)	:	:

Graines:	:	Chrysophanol (28) (59)	:	Matières grasses
	:		:	2,8 % (28)
	:	Emodine (80) (59)	:	
	:	Rhéine (59)	:	
	:	Subst. avec les caractéristiques	:	
	:	d'une 1-8-dihydroxyanthraquinone	:	
	:	(59)	:	
Tronc	:		:	
1,6g (1)	:		:	
Racines :	:		:	
0,30g (57)	:	Chrysophanol anthrone(lib. et	:	
	:	gluc.) (*) (92) (91)	:	
5,67g (1)	:	Chrysophanol (ou physcion)	:	
	:	lib. et comb. (*) (92) (91)	:	
	:	Chrysophanol (59)	:	
	:	Emodine (59)	:	
	:	Rhéine (59)	:	
	:	1-8-dihydroxyanthraquinone (59)	:	
	:		:	

Dérivés anthracéniques		Autres substances
Teneur %	Substances isolées ou caractérisées en chromatographie sur papier (*)	
<u>C. polyantha</u> Moc.		
Fruits :		
0,05g (57)		
<u>C. reticulata</u> Willd.		
Feuilles :		
	Rhéine (73) (2)	
<u>C. rigida</u> Burk.		
Fleurs :		
1,88g (1)		
Tronc :		
1,03g (1)		
Rameaux :		
0,89g(1)		
<u>C. siamea</u> Lam.		
Bois :	Anthrone de l'acide chrysophanique (46)	
Tige et feuilles :		
riche (1)		
Fruits :		
traces (17)		
Graines :		y-sitostérol 0,07g% (13)
<u>C. silvestris</u> Vell.		
Feuilles :		
R. Bornträger		
positive(90)		
<u>C. sophora</u> L.		
Fruits 0,75g (57)		
Graines		β sitostérol 0,07 % (13)

Dérivés anthracéniques	Autres substances
Teneur %	Substances isolées ou : caractérisées en chro- (*) matographie sur papier:
<u>C. speciosa Schrad.</u>	
Feuilles :	:
R.Bornträger :	:
parfois positive(90) :	:
Ecorce :	Chrysophanol (70) :
<u>C. subulata Gris.</u>	
Feuilles :	:
0,85 - 1,04g (1) :	:
Fleurs :	:
1,50g (1) :	:
Rameaux :	:
0,24g (1) :	:
Pedoncules et rachis :	:
0,43g (1) :	:
<u>C. tomentosa L.</u>	
Feuilles :	:
néant (57) :	:
riches anthranols :	:
lib.et com.(17) :	:
Fruits :	:
faible (17) :	:
Tige :	:
néant (57) :	:
traces (17) :	:

Dérivés anthracéniques		Autres substances
Teneur %	Substances isolées ou caractérisées en chromatographie: sur papier (x)	
	C. tora L.(=C.obtusifolia L.)	
Feuilles :		
néant (17)		Kaempférol-3-diglu-
		-coside (33)
Tige :		
néant (17)		
Fruits :		
0,70g (57)		
0,70g (17)		
Graines :		
	Emodine (80)	β sitostérol 0,043
	Chrysophanol(ou physcion)	(13)
	lib.et gluc.(x)(92)(9I)	Matières grasses 5%
	Chrysophanol-anthrone lib.	
	et comb. (x)(49)	
	Emodine lib.et gluc.(x)(92)(9I)	
	Aloe-émodyne lib.et gluc	ac. palmitique,
	(x)(92)(9I)	lignocérique
	Rhéine lib.et gluc.(x)(92)(9I)	oléique, linoléi-
	Chrysophanol (28) (85)	que (28)
	Physcion (85)	
	Obtusifoline (85)	
Racine :		
0,60g (57)	Chrysophanol(ou physcion)	
	lib.et gluc.(x)(92)(9I)	
	Chrysophanol-anthrone lib.	
	et comb. (x) (49)	
	Emodine lib.et gluc.	
	(x) (92)(9I)	
Fleurs :		
	Chrysophanol (ou physcion)	
	lib. (x) (92) (9I)	

- TRAVAUX PERSONNELS -

Chapitre II

TECHNIQUES UTILISEES

Teneur en eau

La teneur en eau a été déterminée par perte de poids à l'étuve à 100°. 2g. de drogue pulvérisée ont été portés 48 heures à l'étuve à 37°, puis à l'étuve à 100° jusqu'à poids constant .

Cendres totales .

2g. de drogue pulvérisée, provenant du dosage précédent, sont calcinés dans un creuset de quartz (d = 70mm) sur un bec Bunsen jusqu'à obtention de cendres blanches.

Recherche des dérivés anthracéniques .

Elle a été effectuée par la méthode indiquée pour l'essai des Sénés à la 8^e édition de la Pharmacopée française. 0,20g. de poudre sont additionnés de 30 ml d'acide sulfurique environ 2 N, on fait bouillir pendant 5 minutes, on filtre à chaud et on agite le filtrat refroidi avec 2 ml de benzène. Le benzène séparé est agité avec son volume d'ammoniaque diluée. La coloration rose de la couche ammoniacale indique la présence de dérivés anthraquinoniques. Quand il existe des dérivés anthracéniques réduits la teinte s'intensifie après chauffage de la liqueur alcaline quelques minutes au bain-marie bouillant.

Dosages des dérivés anthracéniques

Ils ont été effectués par deux méthodes différentes.

La première, à partir d'un infusé est voisine de celles de KUSSMAUL et BECKER (54) et de FAIRBAIRN et MICHAELS (25), la deuxième à partir de la poudre, suivant la technique préconisée par AUTERHOFF (5) .

1) À partir de l'infusé : On prépare un infusé à 1% de drogue, 0,50g. de poudre demi fine sont introduits dans une fiole conique de 125 ml d'eau . On plonge la fiole 10 minutes au bain-marie bouillant en agitant. On centrifuge car la filtration serait très laborieuse. On décante dans une fiole jaugée de 50 ml, on rince la fiole avec quelques millilitres d'eau que l'on verse sur le culot de centrifugation, on centrifuge à nouveau, et on ajuste l'infusé à 50 ml.

Courbe étalon de Sennosides : Les dosages sont effectués par rapport à un mélange à parties égales des sennosides A et B purs (°). Ces substances étant des glucosides d'anthrones, ne donnent de coloration rose en milieu alcalin qu'après hydrolyse acide et oxydation.

On pèse avec précision 0,01 g de sennoside A et 0,01 g de sennoside B, on ajoute 1 à 2 gouttes de potasse environ N pour solubiliser et on ajuste à 50 ml avec de l'eau.

On prélève 10 ml (0,004 g. sennosides), et on hydrolyse 20 minutes au bain marie bouillant par 10 ml d'acide chlorhydrique concentré environ 10 N., les sennosides précipitent en flocons jaune pâle, on agite, après refroidissement, avec de l'éther et on continue l'épuisement par ce solvant .

(°) Obligeamment fournis par le Professeur A.STOLL, de Bâle .

Les solutions éthérées réunies sont épuisées par une solution saturée de bicarbonate de sodium; les solutions bicarbonatées sont neutralisées, puis acidifiées par l'acide chlorhydrique et épuisées par l'éther. Les solutions éthérées sont finalement épuisées par la potasse N. et la liqueur alcaline est ajustée à 100 ml (0,004 g sennosides) .

Le dosage colorimétrique pour l'établissement de la courbe est fait sur des quantités de liqueurs correspondant à 20 à 40 μ g. de sennosides (soit 0,5 - 1 - 2 ; 10 ml complétés à 10 ml avec de la potasse normale). On porte chaque tube 4 minutes au bain-marie bouillant en agitant pour oxyder (la coloration jaune foncé vire au rose violacé) on laisse refroidir, on réajuste à 10 ml s'il y a lieu et on transvase dans les tubes colorimétriques.

On a utilisé pour la lecture le photocolorimètre Electrosynthèse, modèle standard, écran vert (530 m μ) .

La courbe est établie en portant en abscisse les quantités de sennosides, en ordonnée les densités optiques.

Dosage des dérivés libres : On prend 20 ml de l'infusé, et les épuise dans une petite ampoule à décantation par de l'éther employé par 10 ml jusqu'à ce qu'il ne se colore plus. Les solutions éthérées réunies sont alors agitées avec de la potasse environ N, employée par 5 ml jusqu'à ce que la solution aqueuse ne se colore plus. On ajuste à un volume donné et on prélève 10 ml pour le dosage colorimétrique dans les mêmes conditions que précédemment. Une nouvelle lecture est faite après chauffage de 10ml de liqueur, 4 minutes au bain marie bouillant, après refroidissement rapide sous courant d'eau froide et s'il y a lieu ajustage à 10ml.

Dosage des dérivés combinés à l'état de glucosides :

20ml de l'infusé sont introduits dans un petit ballon à col rodé avec 10 ml d'acide chlorhydrique concentré. On chauffe 20 minutes au bain marie bouillant en surmontant le ballon d'un réfrigérant à reflux. Avec certains Cassia notamment les espèces officinales, il se produit un léger précipité. On ajoute 50ml d'éther à la liqueur encore tiède, on agite doucement et on transvase le tout dans une ampoule à décantation. On sépare la couche éthérée et on continue l'épuisement de la liqueur aqueuse par du nouvel éther jusqu'à ce que ce solvant ne se colore plus. Les solutions éthérées réunies sont épuisées successivement par la solution saturée de bicarbonate de sodium puis par la potasse N pour avoir d'une part les dérivés acides, d'autre part les autres dérivés.

Dérivés acides : La solution éthérée est épuisée par la solution de bicarbonate de sodium (20, 10, 10 ml...) jusqu'à ce que celle-ci ne se colore plus en jaune. On réunit les solutions bicarbonatées dans un vase cylindrique, on ajoute 50 ml d'éther puis, goutte à goutte et en agitant, de l'acide chlorhydrique concentré jusqu'à cessation d'effervescence.

On poursuit l'épuisement par ce solvant jusqu'à ce qu'il ne se colore plus. Les solutions éthérées réunies sont ensuite épuisées par la solution N de potasse qui se colore en jaune. On ajuste à 50 ml ou 100ml suivant le cas. Après chauffage de 10 ml au bain marie bouillant la coloration devient rose violacé dans le cas des Sénés officinaux et on fait la lecture après refroidissement.

Autres dérivés : La liqueur éthérée déjà épuisée par le bicarbonate de sodium est épuisée par la solution de potasse N.

On réunit les solutions alcalines et ajuste à un volume donné.

On fait une première lecture sur cette liqueur, une deuxième après oxydation 4 minutes au bain-marie bouillant.

Comme on n'a plus affaire dans ce cas à des sennosides les résultats sont exprimés en istizine (1-8-dioxyanthraquinone).

Une courbe étalon ayant été établie avec cette substance. On rapporte à 100 g de poudre.

2) A partir de la poudre , selon la méthode d'hydrolyse préconisée par AUTERHOFF (5) .

Dérivés acides : 50 - 100 ng de drogue sont traités par le mélange: acide acétique pur 7,5 ml et acide chlorhydrique concentré 1 ml .

On chauffe 15 minutes à reflux sur une petite flamme et après addition de 30 ml d'éther, encore 15 minutes à reflux. On filtre dans une ampoule à décanter, on ajoute 30 ml d'éther au résidu et chauffe encore 10 minutes.

Les solutions éthéro-acétiques réunies sont lavées par 40 ml d'eau, cette phase aqueuse est rejetée.

On ajoute au contenu de l'ampoule 30 ml de solution de bicarbonate de sodium à 10 % et 3,5 de bicarbonate de sodium pulvérisé. Après cessation de l'effervescence, la phase bicarbonatée est versée dans une deuxième ampoule; on continue l'épuisement par le bicarbonate de sodium (2 à 3 fois 10 ml) .

Les solutions alcalines réunies sont additionnées de 40 ml d'éther et d'acide sulfurique à 50 % goutte à goutte. La solution éthérée séparée, est filtrée dans un ballon de 100ml. On continue l'épuisement par l'éther jusqu'à ce que ce solvant ne se co-

lore plus. Les solutions éthérées sont agitées à plusieurs reprises avec de la potasse N. Les liqueurs alcalines sont ajustées à 100 ml. On prélève 10 ml et fait la lecture au photolorimètre après oxydation 4 minutes au bain marie bouillant.

La courbe étalon a été établie avec le mélange de sennosides purs A et B, hydrolysés par la même méthode, et oxydés en milieu alcalin au bain marie bouillant comme dans la technique de dosage à partir de l'infusé.

Autres dérivés : Les liqueurs éthérées épuisées par le bicarbonate de sodium sont agitées avec de la potasse N. Les solutions alcalines sont ajustées à un volume donné, on fait le dosage colorimétrique par rapport à un étalon d'istizine.

Recherche des dérivés flavoniques .

Ces dérivés ont été caractérisés par la réaction de SHIBATA (réaction de la cyanidine) : quelques millilitres d'infusé à 2 % sont additionnés de leur volume d'alcool chlorhydrique (acide chlorhydrique concentré 1 volume, eau 1 vol., alcool à 96° 1 vol.) et de tournure de magnésium. Une coloration allant de l'orangé au violacé selon la nature des dérivés présents et passant dans l'alcool isoamylique, par agitation avec ce solvant, indique la présence de dérivés flavoniques.

Recherche des tanins .

Elle a été effectuée sur l'infusé à 2 % :

- l'addition d'une solution diluée de chlorure ferrique provoque une coloration bleu noir ou brun verdâtre suivant que l'on a affaire à des tanins galliques ou catéchiques.

- 30 ml d'infusé sont additionnés de 15 ml de réactif de Stiasny (formol à 30 % 2 vol. HCl concentré 1 vol.) puis chauffés à température inférieure à l'ébullition. La précipitation prouve la présence de tanins catéchiques.

Après filtration et addition de quelques gouttes de chlorure ferrique dilué au filtrat saturé d'acétate de sodium, une coloration bleu noir indique la présence de tanins galliques.

Dosage des tanins :

2 g de drogue sèche pulvérisée sont mis en contact pendant deux heures avec 180 ml d'eau à 80°. La liqueur est filtrée et le résidu lavé à l'eau chaude jusqu'à obtention d'un volume final de 200 ml. La moitié du filtrat est additionnée de 50 ml de réactif de Stiasny (formol à 30 % 2 vol. ; acide chlorhydrique 1 vol.). Après 24 heures le précipité est recueilli sur deux filtres de même poids, emboîtés l'un dans l'autre, puis lavé à l'eau distillé, jusqu'à élimination de l'acide chlorhydrique. Après séchage à l'étuve à 100°, les filtres sont pesés séparément dans des boîtes à tare. On obtient ainsi par différence la teneur en tanins catéchiques totaux (tanins condensés + catéchines) de 1 g de drogue.

La deuxième partie de la liqueur extractive est traitée par 50 ml de gélatine salée (soluté à 1 % dans une solution saturée de chlorure de sodium) et acidifié par quelques gouttes d'acide sulfurique. Ce réactif précipite les tanins catéchiques condensés mais non les catéchines. On laisse déposer le précipité pendant quelques heures puis on filtre sur kaolin. Le filtrat est ensuite traité comme précédemment par le réactif de Stiasny qui précipite les

catéchines.

Par différence avec les résultats du premier dosage on obtient la teneur en tanins condensés .

Etude en chromatographie sur papier :

Cette méthode a été utilisée pour les essais préliminaires et pour suivre l'extraction et la purification des substances isolées.

Préparation des teintures :

5 g de drogue broyée ont été épuisés par 100 ml d'alcool à 96° bouillant, dans un ballon muni d'un réfrigérant ascendant, pendant 1/2 heure. Les liqueurs, filtrées à chaud, sont concentrées à 10 ml sous pression réduite. Ces teintures ont été utilisées pour l'étude en chromatographie sur papier.

Chromatographie ascendante :

Nous avons utilisé des bocaux cylindriques de 45 cm de haut sur 19 cm de diamètre, munis d'un couvercle de verre. Le solvant développant est placé dans un cristalliseur au centre duquel se trouve un deuxième cristalliseur contenant la phase saturante. Les cuves sont saturées au moins 24 heures avant, à la température de $18 \pm 1^{\circ}$.

Les taches de 10 μ l sont placées à l'aide d'une micropipette sur une ligne horizontale tracée à 5 cm du bord inférieur du papier, les taches sont distantes entre elles de 1,5 cm et à 2,5 cm des bords de la feuille.

La feuille (28 x 40) est roulée en cylindre à l'aide d'épingles d'acier inoxyidable .

Chromatographie descendante :

Nous avons utilisé des cuves de verre parallélépipédiques (15 x 30 x 35) . Le solvant est placé dans une auge spéciale demi-cylindrique en verre, disposée à la partie supérieure. Un récipient est placé au fond de la cuve et contient la phase saturante. Les taches sont placées à l'aide d'une micropipette sur une ligne horizontale située à 10 cm du bord .

Papiers : Arches 301, 302, Whatman N°1; Arches 301 imprégné de borate de sodium.

Solvants :

- 1 . Le mélange de Partridge (n-butanol, acide acétique pur, eau 4 ; 1 ; 5 v/v) .
- 2 . Le mélange alcool isoamylique, hexane, acide acétique, eau 3 ; 1 ; 3 ; 3 v/v)
- 3 . n-butanol, pyridine, eau (6 ; 4 ; 3)
- 4 . Toluène ou toluène saturé d'eau (10)
- 5 . Butanol saturé d'eau. (19)
- 6 . Butanol, méthanol, eau (5 ; 2 ; 2) (77)

Révélateurs :

En dehors de la lumière ultraviolette, les révélateurs utilisés ont été :

- Potasse alcoolique à 5 %, colore les flavonoïdes en jaune et les anthraquinones libres en rose à rouge.
- Borate de sodium à saturation dans l'eau, colore les flavonoïdes en jaune, donne des fluorescences jaunes avec certains anthranols et colore les anthraquinones en rose à rouge .
(SCHRATZ) (77) .

- Alun de potassium à 5 % dans l'eau donne une fluorescence verte avec certains flavonoïdes et colore les anthraquinones et anthranols en jaune (77)
- Acétate de magnésium à 1 % dans le méthanol colore les anthraquinones en rouge brillant et les dianthrone en brun, donne une fluorescence verte avec les flavonoïdes et une fluorescence jaune avec les anthranols (SCHRATZ) (77) .
- Chlorure ferrique à 1 % dans l'alcool à 96°, révélateur des phénols, en particulier des tanins et des dérivés flavoniques polyhydroxylés .
- Les vapeurs d'acide chlorhydrique révèlent certains chromogènes, leucoanthocyaniques notamment :

Révélateurs des oses .

1) Phosphate d'aniline :

Aniline redistillée	0,40 ml
Thymol	2 g
Acide phosphorique	2 ml
Ethanol à 96°, Q.S.P.	150 ml

Le chromatogramme est porté quelques minutes à l'étuve à 100° .

2) Nitrate d'argent ammoniacal .

Solution alcoolique à 5 % de nitrate d'argent dans laquelle l'ammoniaque est ajoutée goutte à goutte, jusqu'à disparition du précipité initial d'hydroxyde d'argent.

Le chromatogramme est séché à l'étuve à 100 pendant quelques minutes.

Méthode des chromatoplaques ;

A côté de la chromatographie sur papier nous avons eu

recours aux chromatoplaques surtout pour l'identification des génines anthracéniques.

Les plaques ont été préparées par la technique DEMOLE (15) modifiée par PARIS (61) .

Nous avons utilisé des plaques de verre de 13 x 18 x 0,2 cm .

On dépose une pâte liquide obtenue de la façon suivante : 2 g d'amidon de maïs sont délayés dans 100 ml d'eau puis portés au bain marie bouillant 5 minutes de façon à obtenir un empois homogène auquel on ajoute en remuant soigneusement 25 g d'acide silicique (Mallinckrodt 100 mesh.) .

Cette pâte encore tiède est étendue en couche mince (1 mm) à l'aide d'un "appareil à pelliculer" sur les plaques de verre bien propres . On laisse sécher horizontalement pendant quelques heures à la température ordinaire . Les plaques sont utilisées en chromatographie ascendante.

Pour les génines anthracéniques, les meilleurs résultats ont été obtenus avec les mélanges: hexane, acétate d'éthyle (9 ; 1) , (8 ; 2) ; comme révélateur la potasse alcoolique à 5 % .

Chapitre III

ETUDE DU CASSIA GORATENSIS Fresen

(= C. Singueana Del.)

A - Etude des feuilles (Provenance : Cameroun)

I - Essais préliminaires .

Teneur en eau : 6,26g %

Cendres totales : 5,54g %

Recherches des dérivés anthracéniques .

Elle a été effectuée par la méthode indiquée pour les Sénés à la 8^{ème} édition de la Pharmacopée française: épuisement par le benzène après hydrolyse acide d'un infusé à 1 %, puis agitation de la liqueur organique avec l'ammoniaque . La phase ammoniacale est colorée en jaune, après oxydation à l'air, elle devient orangé-brun, et non rose ou rouge comme dans le cas des dérivés anthracéniques.

Si on épuise l'infusé à 1 % par l'éther, ce solvant se colore en jaune, mais quand on agite la solution étherée avec la potasse N, la solution alcaline prend une teinte jaune et après oxydation elle devient brun foncé ce qui ne correspond pas à la teinte des dérivés anthraquinoniques.

D'autre part, l'hydrolyse acide dans les conditions du dosage des dérivés anthracéniques totaux a été pratiquée. La liqueur étherée d'épuisement a été agitée successivement avec une solution saturée de bicarbonate de sodium et avec la potasse

normale.

Ces solutions prennent une faible teinte jaune. La teinte de la solution de potasse ne change pas par oxydation (chauffage au bain marie bouillant pendant quelques minutes en agitant).

La solution bicarbonatée a été acidifiée puis épuisée par l'éther. Ce solvant a été agité avec la potasse normale. La solution alcaline colorée en jaune faible n'a pas changé de teinte après oxydation au bain marie bouillant.

Il n'existe donc pas de dérivés anthracéniques dans les feuilles de C. goratensis .

Recherches sur l'infusé à 2 % .

Cet infusé a une teinte jaune orangé qui s'intensifie par addition de potasse.

Par addition d'un volume égal d'alcool à 50° chlorhydrique et de quelques centigrammes de tournure de magnésium (réaction de la cyanidine) il apparait une coloration rose rouge indiquant la présence de dérivés flavoniques .

L'addition de quelques gouttes d'une solution diluée de chlorure ferrique à l'infusé, provoque l'apparition d'une coloration vert

On obtient un abondant précipité, en ajoutant un volume égal de réactif de Stiasny (formol à 30 % 2volumes, acide chlorhydrique concentré 1 volume) et en chauffant 30 minutes au bain-marie à température inférieure à l'ébullition; ce précipité indique la présence de tanins catéchiques; le filtrat est saturé d'acétate de sodium pulvérisé et on ajoute quelques gouttes de chlorure ferrique. On a une coloration rouge et non bleu-noir,

donc absence de tanins galliques.

Si on ajoute 1 ml d'acide chlorhydrique concentré à 5ml d'infusé et qu'on porte à l'ébullition, il se produit une coloration rouge et un précipité de phlobaphènes.

Il existe donc des tanins catéchiques en quantité notable dans les feuilles de C. gora tensis .

Dosage des tanins catéchiques et catéchines (technique décrite p.51) a été effectué par le réactif de Stinsny et la solution de gélatine salée. Nous avons trouvé :

1 % de catéchines

11,8 % de tanins totaux (tanins catéchiques et catéchines)

Etude en chromatographie sur papier de la teinture au 1/5 concentrée de façon que 2 ml correspondent à 1 g de drogue, méthode ascendante, solvant de Partridge, sur papier Arches 302 .

Température = $20 \pm 1^{\circ}$. On observe 4 taches :

Rf 0,45, jaune en lumière ordinaire, gris aux U.V. jaune après potasse dans le visible (jaune brun aux U.V.) ; jaune après borate de sodium, alun de potassium et acétate de magnésium. Gris vert avec chlorure ferrique.

Rf 0,55, mêmes colorations .

Rf 0,75 et 0,90 : 2 taches moins distinctes, colorées en jaune vert aux U.V., mais formant une traînée rouge brun après potasse et brun verdâtre après chlorure ferrique.

Les 2 premières taches semblent correspondre à des dérivés flavoniques, les autres à des tanins catéchiques.

Recherche d'un chromogène .

La réaction indiquée à la V^e édition de la Pharmacopée

Helvétique pour la recherche de la falsification des Sénéés officinaux par C. auriculata (qui va également figurer à la 8^e édition de la Pharmacopée française) a été effectuée :

"Placez sur un porte-objet reposant sur fond blanc un fragment de feuille de Séné et ajoutez une goutte d'acide sulfurique à 80 % la préparation ne doit pas se colorer en rouge carmin."

Cette réaction étant franchement positive avec l'échantillon de feuilles de C. goratensis et de même intensité que celle fournie par les feuilles de C. auriculata, son étude a été poursuivie.

Cette coloration rouge, donnée sous l'influence des acides par les feuilles de C. auriculata a été signalée par divers auteurs VAMOSSY (1920) (95) ; HOLTZEM (1958) (44); FORSDIKE (1949) (29); DENOEL (1960) (16) mais uniquement pour cette espèce .

DENOEL a appliqué cette réaction à la chromatographie sur papier de teintures de feuilles de Cassia auriculata par la méthode ascendante avec le solvant butanol acétique de PARTRIDGE sur papier Whatman N° 1 . Il signale par traitement du chromatogramme par les vapeurs d'acide chlorhydrique une tache rouge, allongée, de Rf 0,60 à 0,94 , s'intensifiant à l'étuve à 100° .

Le chromatogramme préparé dans ces conditions sur papier Arches 302, avec 10 μ l de la teinture au 1/2 de feuilles de C. goratensis a été traité par les vapeurs d'acide chlorhydrique, on obtient une traînée de Rf 0,60 à 0,95 , violet intense .

Cette coloration s'atténue peu à peu mais réapparaît par nouvelle exposition aux vapeurs d'acide. Au bout d'un certain temps elle devient brunâtre.

Nous avons donc effectué, sur les feuilles de C. gora-
tensis, toutes les réactions décrites par DENOEL pour la poudre
 de feuilles et la teinture de C. auriculata . Quelques centigram-
 mes de poudre placés dans une capsule de porcelaine ont été ad-
 ditionnés de différents réactifs :

Réactifs	:	à la température	:	après chauffage sur
	:	du laboratoire	:	une petite flamme.
	:		:	
H ₂ SO ₄ à 80 %	:	rouge brun	:	rouge brun
	:		:	
HCl à 36 % (= acide chlorhy- drique concentré du commerce)	:	o	:	violet
	:		:	
	:		:	
H ₃ PO ₄ à 85 %	:	o	:	violet
	:		:	
	:		:	

D'autre part nous avons essayé l'acide nitrique concen-
 tré et l'acide acétique pur cristallisable.

HNO ₃ à 63 %	:	jaune orangé	:	jaune orangé
	:		:	
ac. acétique pur	:	o	:	o
	:		:	

Les réactions sont donc identiques à celles décrites
 par DENOEL pour le Cassia auriculata.

Une teinture est alors préparée selon la technique de
 DENOEL , pour améliorer la sensibilité de la réaction : "on in-
 troduit dans un tube à essais 200 mg de poudre à analyser et 3
 ml d'alcool à 94°C, on agite durant 3 minutes puis on filtre, le
 filtrat verdâtre est décoloré par addition de 100 à 200 mg de

charbon adsorbant, on filtre et, à la solution incolore, on ajoute un volume égal de H_2SO_4 20 N "

Lateinture ainsi préparée et décolorée a été additionnée de son volume des réactifs suivants :

Réactifs		à la température du laboratoire	au bain-marie bouillant
H_2SO_4	20 N	rose clair	violet
HCl	à 36 %	rose clair	violet
H_3PO_4	à 85 %	o	violet clair
$SbCl_3$	à 5 % dans le chloroforme	o	rose
HNO_3	à 63 %	orangé rouge	orangé rouge
ac. acétique pur		o	o

Toutes ces réactions concordent avec celles indiquées par DENOEL pour C. auriculata.

II - Etude du chromogène .

1 - Extraction

L'extraction de la substance responsable de cette coloration avec les acides concentrés a été tentée

DENOEL signale sa solubilité dans l'éthanol à 94°, le mélange éther sulfurique - méthanol ; l'acétate d'éthyle.

L'extraction a été effectuée sur 150 g de feuilles pul-

vérisées, dans un appareil de Soxhlet, par les solvants successifs, après macération d'une nuit. Chaque épuisement a été poursuivi pendant 4 heures. Il a été fait plusieurs extractions successives avec le même solvant; la présence de la substance responsable de la réaction colorée a été suivie par agitation de 5 ml d'extrait non concentré avec 1 ml d'acide chlorhydrique concentré et chauffage éventuel au bain-marie pour développer la coloration.

D'autre part 10 ml de chaque liqueur d'extraction ont évaporés dans un cristalliseur taré, pour avoir le rendement en extrait sec.

- 1 . Ether de pétrole: 4 extractions. Rendement total 5,50 % .
Extrait ciroux verdâtre. Avec HCl concentré pas de coloration même en chauffant . H_2SO_4 concentré, coloration rouge à froid. La réaction de Liebermann (anhydride acétique + H_2SO_4) donne une coloration verte indiquant la présence de stérols .
- 2 . Chloroforme: 5 extractions de 4 heures. Rendement total 23 % . Extrait noirâtre. Avec HCl concentré ne réagit pas à froid, donne une coloration rougeâtre au bain-marie bouillant.
- 3 . Ether: 7 extractions de 4 heures. Rendement total 9,9 % .
Extrait résineux brunâtre, avec HCl concentré, coloration violette à froid.
- 4 . Acétate d'éthyle: 5 extractions, toujours de même durée. Rendement 11,3 % . Extrait rouge brunâtre; HCl à froid rose, au bain-marie violet.
- 5 . Acétone: 4 extractions. Rendement 1,6 % . Extrait rouge brunâtre où quelques cristaux apparaissent qui ont été étudiés ultérieurement. (x) "voir page suivante "

6 . Méthanol: 3 extractions. Rendement 7,6 % . Extrait rouge brunâtre, HCl: rouge à froid.

7 . Ethanol: 3 extractions. Rendement 1,3 % . Extrait brunâtre. HCl: rose clair à chaud.

(*) Il s'agit vraisemblablement de mannitol d'après les résultats de la chromatographie sur papier avec un témoin de cette substance (révélation par le nitrate d'argent ammoniacal.)

Ce chromogène passe donc dans tous les extraits à partir de l'éther et notamment dans ce dernier solvant.

Des chromatographies ont été effectuées avec les extraits secs repris par l'alcool à 96° (solution à 4 % de chaque extrait) 10₁ par tache. Solvant butanol acétique de Portridge. Révélateur vapeurs d'acide chlorhydrique .

Les extraits éthéro-pétrolique et chloroformique ne donnent aucune coloration dans ces conditions.

L'extrait éthéré donne la réaction la plus intense (tache de Rf 0,60 - 0,90) puis l'extrait acétate d'éthyle.

Les extraits acétonique, méthanolique et éthanolique donnent une réaction très faible.

D'autre part nous avons révélé un chromatogramme par la potasse alcoolique à 5 % .

a) Lumière du jour. b) Lumière ultra-violette.

Rf	Ether de pétrole	Chloroforme	Ether	Acétate d'éthyle	Acétone	Méthanol	Ethanol
----	---------------------	-------------	-------	---------------------	---------	----------	---------

- Avant KOH

0,90 a)	o	jaune ⁺⁺ ₋	jaune ⁺ ₋	jaune ⁺ ₋	o	o	o
b)	o	jaune ⁺	jaune ⁺	jaune ⁺	jaune ⁺	jaune ⁺ ₋	jaune ⁺ ₋
0,75 a)	o	jaune [±]	jaune [±]	jaune [±]	o	o	o
b)	o	jaune ⁺	jaune ⁺	jaune	jaune ⁺ ₋	jaune [±]	jaune [±]
0,55 a)	o	o	o	jaune ⁺ gris ⁺	o	o	o
b)	o	o	o	gris ⁺	o	o	o
0,45 a)	o	o	o	jaune ⁺	jaune	jaune	jaune
b)	o	o	o	gris ⁺	gris	gris	gris

- Après KOH

Extraits

0,90 a)	o	jaune	une traînée	une traînée	une traînée	une traînée	une traînée
b)	o	jaune	brune	brune	brune	brune	brune
0,75 a)	o	jaune	brune	brune	brune	brune	brune
b)	o	jaune					
0,55 a)	o	o	o	jaune	o	o	o
b)	o	o	o	jaune gris	o	o	o
0,45 a)	o	o	o	jaune	jaune	jaune	jaune
b)	o	o	o	jaune gris	jaune gris	jaune gris	jaune gris

Les taches de Rf 0,45 et 0,55 surtout présentes sur le chromatogramme de l'extrait d'acétate d'éthyle semblent correspondre aux dérivés flavoniques.

La potasse donne une traînée brune avec les extraits étherés et acétate d'éthyle, plus légère avec les extraits acétoniques, méthanolique et éthanolique, elle se trouve au même niveau que la tache rouge violacé obtenue par les vapeurs d'acide chlorhydrique et qui semble donc correspondre au chromogène.

2 - Essais de purification - 200 g de feuilles ont été traitées dans un appareil de Soxhlet, dans les mêmes conditions. L'extrait étheré étant le plus riche en chromogène, différents essais de purification et d'extraction ont été effectués sur cet extrait.

a). Par précipitation de l'extrait étheré au moyen de l'éther de pétrole.

L'extrait étheré de la première extraction a été concentré et versé dans 10 volumes d'éther de pétrole. Le précipité formé a été recueilli par centrifugation. Il est beige clair, léger, il représente 2,6 g (soit 3,7 % de la plante sèche) et donne fortement la réaction avec l'acide chlorhydrique concentré. Les liqueurs mères la donnant encore nettement ont été évaporées à consistance d'extrait sec qui a été séché dans le vide en présence d'anhydride phosphorique.

D'autre part, chaque extrait étheré provenant de la deuxième extraction, a été concentré séparément, les deux premiers à 100 ml, les autres à 50 ml puis versé dans 10 volumes d'éther de pétrole.

Les précipités beige clair formés ont été immédiatement

recueillis par centrifugation, lavés à l'éther de pétrole, séchés dans le vide en présence d'anhydride phosphorique.

Rendements

1^{re} extraction 6,68 g soit 3,34 % de la plante

2^e " 1,67 g " 0,83 "

3^e " 1,66 g " 0,83 "

4^e " 1,01 g " 0,50 "

soit un rendement total de 5,50 % .

Les différents précipités en solution alcoolique à 5 % ont été étudiés en chromatographie ascendante, sur papier Arches 302, solvant de Partridge 10 ul par tache. En lumière ultra-violette on observe toujours 2 taches de Rf 0,75 jaune vert, et de Rf 0,90 jaune peu intense et, après révélation par les vapeurs d'acide chlorhydrique, une traînée rouge violacé de Rf 0,60 à 0,90.

La tache de Rf 0,75, jaune vert aux U.V., est très intense pour les quatre premiers précipités, elle s'atténue pour les derniers alors que les vapeurs d'acide chlorhydrique donnent une tache toujours aussi intense.

b). Autre essai de purification du produit brut.

1 gramme de précipité brut a été dissous à l'ébullition dans 10 ml d'acétate d'éthyle préalablement déshydraté sur sulfate de sodium anhydre, on filtre à chaud. Le filtrat additionné d'un ml d'éther de pétrole, donne un léger précipité qui a été recueilli, séché, puis examiné en chromatographie sur papier dans les conditions précédemment décrites (butanol acétique, papier Arches 302, révélation par les vapeurs d'acide chlorhydrique). Il donnait faiblement la réaction colorée. Il a donc été rejeté.

Un volume égal d'éther de pétrole a été ajouté au nouveau filtrat. Le précipité obtenu a été centrifugé, séché. Il représente 0,60 g. Cette opération a été répétée à trois reprises et il a été finalement obtenu 0,40g d'une substance ne renfermant plus d'impuretés décelables en chromatographie sur papier.

c). Epuisement par différents solvants. Dans un microkumagawa, 1,50g d'extrait étheré brut a été mélangé à du Kieselguhr (Hyflo-supercel) puis introduit dans une nacelle dont le fond est une plaque de verre fritté.

L'épuisement a été effectué par les solvants suivants:

Ether de pétrole: 2 épuisements de 4 heures. Le solvant se colore faiblement en vert, mais ne renferme pas la substance chromogénique

Chloroforme: 3 épuisements de 4 heures, pas de coloration du solvant avec HCl concentré

Ether: 1^e extraction: 1 heure - Réaction très forte

2^e extraction: 4 heures - Réaction moins intense

Le produit restant dans la nacelle ne donne plus que faiblement la coloration.

d). Fractionnement sur colonne d'acide silicique.

1/ Les liqueurs étherées d'épuisement par le microextracteur ont été évaporées à sec sous pression réduite, le résidu pulvérisé (1,30 g) a été mélangé avec de l'hyflo-supercel et placé sur une colonne préparée avec 40 g de silice (acide silicique Mallinckrodt 100 Mesh) et 80 ml d'éther de pétrole.

L'élution a été faite successivement par 200 ml de chacun des solvants suivants.

Ether de pétrole, chloroforme, chloroforme 9 - éther 1, chloro-

forme 4 - éther 1. Ils n'éluent aucune substance . Le mélange chloroforme 3 - éther 2 (en volumes) entraîne une substance donnant en chromatographie sur papier dans des conditions déjà décrites : 2 taches jaune vert aux U.V. ; de Rf 0,70 et 0,85 mais ne se colorant pas par les vapeurs d'acide. Les mélanges :

chloroforme	1	-	éther	1
"	2	-	"	3
"	3	-	"	7

n'entraînent pas le chromogène, les 2 taches signalées plus haut, jaune vert aux U.V. sont de moins en moins intenses sur les chromatogrammes .

Le mélange chloroforme 1 - éther 4 élue le chromogène . Le solvant évaporé laisse un résidu blanchâtre qui brunit rapidement à l'air et donne intensément la réaction violette avec l'acide chlorhydrique .

2/ Une seconde colonne a été préparée avec 0,50 g d'extrait étheré brut et 20 g de silice et l'élution menée plus rapidement avec 400 ml de chacun des solvants suivants :

Chloroforme	3	-	éther	1
"	2	-	"	3

qui éluent les substances donnant la fluorescence jaune vert aux U.V. , mais non le chromogène .

Le mélange chloroforme 1 - éther 4 élue le chromogène, par évaporation on obtient 0,12 g d'un produit blanchâtre donnant une réaction violette intense avec l'acide chlorhydrique concentré.

En solution à 2 % dans l'alcool à 95°, cette substance examinée en chromatographie sur papier, dans le mélange de Partridge, ne donne aucune tache visible dans l'ultra-violet mais après exposition aux vapeurs d'acide chlorhydrique une tache vio-

lette intense de Rf 0,60 - 0,95 .

3/ Une nouvelle colonne de silice a été imprégnée de bisulfite de sodium pour éviter l'oxydation du chromogène .

30 g de silice et 1,5 ml de solution de bisulfite de sodium pur ($d = 1,24$) ont été mélangés et séchés à l'air; 1 g du précipité par l'éther de pétrole de l'extrait étheré concentré a été placé sur la colonne ainsi préparée .

L'élution a été faite par les solvants suivants :

chloroforme	3	-	éther	2	=	300 ml
"	2	-	"	3	=	360 ml
"	1	-	"	4	=	720 ml

Les deux premiers mélanges entraînent toujours les impuretés qui ne donnent pas la réaction du chromogène, mais présentent en chromatographie sur papier des taches de fluorescence jaune vert aux U.V.

Après élution par le mélange chloroforme 1 - éther 4, nous avons obtenu par évaporation du solvant 0,39 g d'un résidu blanchâtre, présentant avec intensité la coloration violette avec l'acide chlorhydrique concentré .

L'étude en chromatographie sur papier, d'une solution à 5 % de ce produit purifié montre une très légère tache de Rf 0,90 jaune aux U.V. et, après révélation par les vapeurs d'acide chlorhydrique, une tache intense, rouge violet, Rf : 0,60 - 0,95 .

e). Essais de cristallisation .

Le précipité par l'éther de pétrole de l'extrait étheré brut a été traité à l'ébullition par les solvants suivants: eau, éther, acétate d'éthyle, acétone, alcool à 60°, 45°, 30°, 15°, cyclohexane, toluène. Les liqueurs ont précipité par refroidissement mais sans cristalliser.

Cependant avec une solution à 2 % dans l'alcool à 30°, filtration à chaud sur talc, ont été obtenus par refroidissement quelques cristaux en aiguilles qui ont été étudiés en chromatographie sur papier. Dans le solvant de Partridge, sur papier d'Archès 302, le produit donne 2 taches jaunes de Rf 0,95 et 0,82, jaunes aux U.V. après KOH. Celle de Rf 0,82 est plus intense. Elles ne changent pas de coloration aux vapeurs d'acide chlorhydrique. La réaction de la cyanadine est positive sur ce mélange de substances. Il s'agit vraisemblablement de génines flavoniques qui se trouvent mêlées au chromogène. Ce dernier reste dans les eaux mères.

3 - Etude du chromogène purifié :

a) Propriétés physiques :

Le produit purifié sur la colonne de silice est une poudre blanche qui rougit rapidement à l'air. Il est insoluble dans l'éther de pétrole, le benzène, le chloroforme; peu soluble dans l'eau et l'éther; très soluble dans l'acétate d'éthyle, l'acétone, l'alcool à 60° et 96°. Son point de fusion instantané est 274-275° (bloc Maquenne). Il a une saveur astringente.

Le rougissement à l'air de la substance, notamment en milieu acide, le virage de la coloration au jaune brun en milieu alcalin, les solubilités, la difficulté de cristallisation font penser à un chromogène du groupe des leucoanthocyanes. (55)

Pouvoir rotatoire.

Une solution méthanolique à 0,25 % du produit a été examinée. Elle est fortement colorée et dans ces conditions nous n'avons pu observer de déviation. Une solution acétonique à 0,50 % est aussi dénuée de pouvoir rotatoire.

Chromatographie sur papier :

Les premiers essais ont été faits par la méthode ascendante avec du papier Arches 302 et comme solvant le butanol acétique (n-butanol, acide acétique, eau : 4 - 1 - 5) . Aucune tache n'a été notée en lumière ultra-violette .

Les vapeurs d'acide chlorhydrique révèlent une tache rouge violet de Rf s'étendant de 0,60 à 0,90 ; Par la suite d'autres révélateurs ont été essayés :

-par le réactif paranitraline : une tache jaune orangé de même Rf que précédemment . Elle devient rougeâtre après pulvérisation d'une solution de carbonate de sodium à 20 % .

-après pulvérisation d'une solution aqueuse renfermant 0,3 % de chlorure ferrique et 0,3 de ferricyanure de potassium une tache bleu vif Rf 0,60 - 0,90 .

-d'autre part la solution alcoolique à 3 % d'acide p-toluène sulfonique (utilisée par ROUX pour les leucoanthocyanes) , après pulvérisation et chauffage à l'étuve à 100° quelques minutes, révèle une tache rouge violacé de même Rf . (74)

D'autres solvants ont été alors recherchés dans le but d'obtenir des taches moins allongées qu'avec le butanol acétique.

-le mélange alcool isoamylique-hexane-acide acétique-eau(3-1-3-3) ne donne pas de meilleurs résultats, bien au contraire : traînée de la ligne de départ à Rf 0,95 .

-l'acide acétique à 2 %, signalé par HARBORNE , donne une tache allongée de la ligne de départ à Rf 0,32 . (41)

-le solvant de Forestal (acide acétique, acide chlorhydrique, eau : 30 - 3 - 10) donne deux taches distinctes, de Rf respectifs

0,65 et 0,85 brunes dans le visible et aux U.V. ; ces taches, révélées en rouge violacé par les vapeurs d'acide chlorhydrique, deviennent confluentes .

-Enfin une chromatographie bi-dimensionnelle a été pratiquée pour voir si la tache allongée correspondait à plusieurs produits : solvants employés dans la première dimension n-butanol, acide acétique, eau (4 - 1 - 5) papier Arches 302 , 16 heures (31) (74) . Dans la deuxième dimension : acide acétique à 2 % , 5 heures . On a ainsi deux taches bien séparées, d'intensité égale, Rf 0,09 et 0,22 correspondant donc à deux substances voisines appartenant toutes deux au groupe des leucoanthocyanes, se colorant en rouge violacé par les vapeurs d'acide chlorhydrique et par la solution alcoolique d'acide p-toluène sulfonique.

Etude en chromatographie sur plaque :

Nous avons déposé sur la plaque 5 μ l de solution à 5 % du produit purifié, aucune tache ne se révèle aux U.V. mais, après exposition aux vapeurs d'acide, il apparait une seule tache rouge violet :

- dans l'acétate d'éthyle contenant 2,5 % de méthanol; de Rf: 0,70
- dans l'acétate d'éthyle contenant 2,5 % d'hexane, de Rf : 0,85
- dans le mélange acétate d'éthyle, éther(30-70), de Rf : 0,65 .

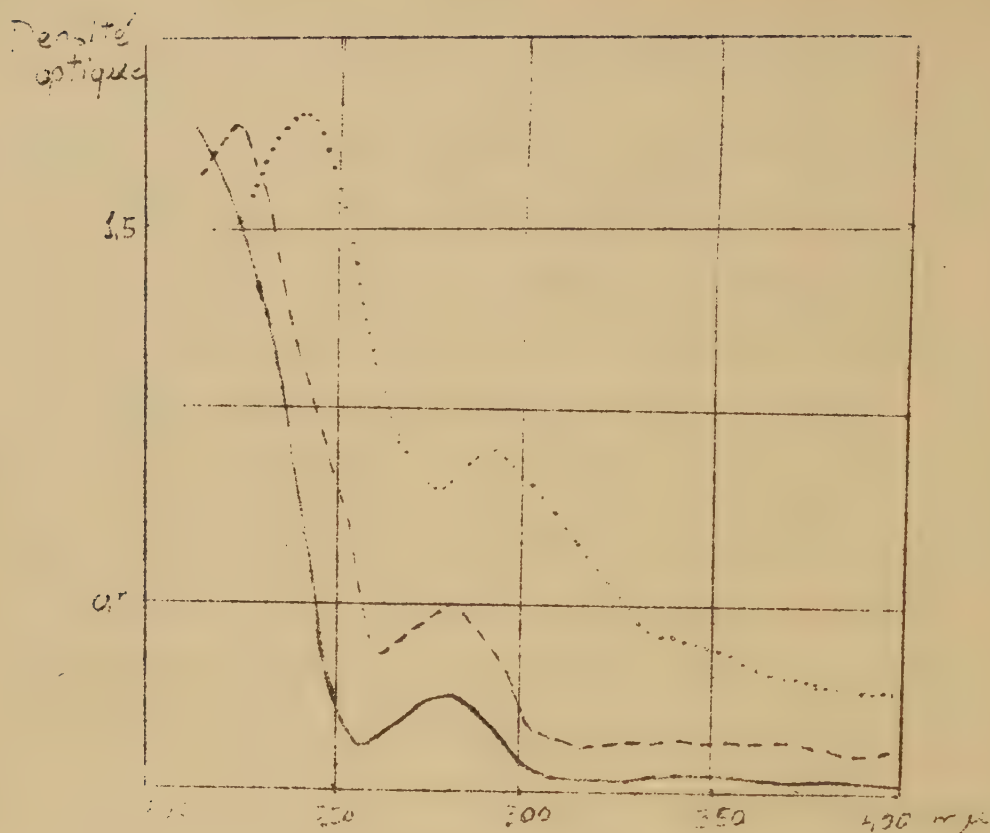


fig.5- Spectre Ultra-violet de la leucoanthocyanidine
du Cassia goratensis .

- Solution $\frac{1}{20.000}$ dans l'alcool à 96°
- Solution dans l'alcool à 30° additionné de
bicarbonate de sodium .
- ... Solution dans l'alcool à 30° additionné de
carbonate de sodium .

Spectre ultraviolet :

Cette détermination a été effectuée avec le spectrophotomètre UNICAM S.P. 500 sur les différentes solutions du chromogène

- le spectre d'une solution à 1/20.000 dans l'alcool à 96°C montre une forte absorption vers 225 mμ, un minimum à 255 mμ et un maximum à 280 mμ, puis une chute brusque de l'absorption . (fig. 5)
- avec la solution du produit à 1/20.000 dans du bicarbonate de sodium 0,1 N dans l'alcool à 30°C nous avons 2 maximums à 230 et 280 mμ et un minimum à 260 mμ , après 280 mμ une décroissance de l'absorption dans l'ultra-violet (fig. 5)
- tandis que dans la solution de carbonate de sodium 0,1 N les maximums sont à 240 mμ et à 290 mμ et le minimum est à 275 mμ (fig. 5)

D'après ces spectres nous avons conclu que le produit a des fonctions phénoliques mais non acides .

D'autre part il existe un maximum à 290 mμ, en milieu carbonaté comme avec les leucoanthocyanes mais non à 298 mμ comme avec les catéchines (9bis) (BATE-SMITH et SWAIN)

Spectre infrarouge :

Il a été effectué avec l'appareil de BAIRD , pour la substance en suspension dans le Nujol . Il montre des bandes à 2,9 (hydroxyles) 6,2 - 6,6 et 8,6 (doubles liaisons benzéniques) 9 - 11,9 μ . Il n'existe pas, comme dans le cas des flavones, de bande à 6,1 μ (carbonyle) .

Analyse élémentaire

A été faite sur le produit purifié sur colonne d'acide silicique et desséché sous vide en présence d'anhydride phospho-

rique pendant 2 heures à la température d'ébullition du chloroforme (perte de poids 8 %)

Elle a donné les résultats suivants :

C % 60,92 ; H % 5,62 ; O % 33,30 (par différence)

Calculé pour $C_{15}H_{14}O_6$, $0,5 H_2O$

C % 60,25 ; H % 5,06

b) Propriétés chimiques .

Le leucoanthocyane brut présente les réactions caractéristiques de cette catégorie de substances :

- coloration rouge violacé sous l'influence des acides concentrés, plus rapide à chaud et plus nette en milieu alcoolique, l'anthocyane formé passe dans l'alcool amylique.
- avec la lessive de potasse N, une coloration jaune orangé.

Pouvoir réducteur .

La solution de nitrate d'argent ammoniacal est réduite par le produit.

La liqueur de Fehling est réduite également à l'ébullition, on obtient une coloration bleu vif par le réactif au ferri-cyanure ferrique (sol. aqueuse renfermant 0,3 % de chlorure ferrique et 0,3 % de ferricyanure de potassium).

Réactions des hydroxyles phénoliques .

La solution saturée dans l'alcool à 95° est jaune orangé elle donne les réactions colorées suivantes :

- avec quelques gouttes de chlorure ferrique dilué, une coloration verte.
- avec le réactif à la p-nitraniline une coloration rouge orangé; après addition de quelques gouttes d'une solution de carbo-

nate de sodium à 20 % elle devient rouge brun .

- avec quelques gouttes d'une solution de vanilline à 1 % dans l'alcool chlorhydrique à 20 % une coloration rouge
- avec quelques gouttes d'une solution aqueuse d'acétate d'uranium à 1 % , une coloration rouge brun .
- Quelques gouttes d'une solution alcoolique de dibromo-2-6 quinone chlorimide à 0,05 % et une goutte de potasse à 1 % : une coloration orangée .
- avec une goutte d'une solution alcoolique de p-aminophénol à 0,1 % et une goutte de potasse à 1 % une coloration violet intense .

Réaction des orthodiphénols :

La solution du produit dans l'alcool chlorhydrique à 1 % donne une coloration verte par addition d'une solution aqueuse de molybdate d'ammonium à 5 % , mais non la coloration jaune provoquée par les leucoanthocyanes qui ont deux hydroxyles en ortho (72) .

Le leucoanthocyane est-il un hétéroside ?

Recherche des sucres libres : dans la substance chromogénique purifiée sur colonne de silice . Une solution à 20 % du produit, a été soumise à la chromatographie descendante continue sur papier Arches 302 dans le solvant butanol-pyridine-eau (6-4-3) pendant 23 heures à $20^{\circ} \pm 1^{\circ}$. Après révélation par le phosphate d'aniline, séchage quelques minutes à 100° , aucune tache brune n'a été observée . Le produit purifié sur colonne ne renferme donc pas de sucres réducteurs.

Essais d'hydrolyse acide du chromogène purifié : 0,18 g de produit ont été traités par 18 ml d'acide sulfurique à 2 % en poids, 2 heures au bain marie bouillant. Il se forme un préci-

pité rougeâtre, qui est recueilli sur filtre de Gooch, lavé à l'eau, séché (0,139 g) . Les eaux mères sont neutralisées par le carbonate de baryum, filtrées, concentrées à 0,9 ml pour avoir une solution à 20 % du produit de départ, qui a été soumise à la chromatographie (taches de 20 et 30 μ l) dans les mêmes conditions que précédemment . Aucune tache d'ose n'a été obtenue .

Il n'y a donc pas eu libération de sucres réducteurs sous l'influence du chauffage en milieu acide et nous n'avons donc pas affaire à un hétéroside

Etude du précipité rougeâtre obtenu après hydrolyse acide :

- Avec la solution de potasse N on a une coloration rouge brun.
- l'acétate de nickel à 5 % provoque une coloration verdâtre .
- avec quelques gouttes de la solution de chlorure ferrique une coloration brune .

Par chromatographie sur papier et sur plaque, dans les conditions décrites précédemment, on observe, avant révélation, une traînée rougeâtre surtout nette depuis la ligne de départ jusqu'à Rf 0,30 mais visible jusqu'au front du solvant ; elle s'intensifie légèrement par les vapeurs d'acide chlorhydrique mais beaucoup moins que ne le fait le produit de départ. (la coloration obtenue par l'acide chlorhydrique avec le précipité d'hydrolyse est environ 15 fois plus faible que celle obtenue avec le produit de départ)

En résumé, le leucoanthocyane n'est pas un hétéroside , il s'agit d'une leucoanthocyanidine ; on obtient un produit d'altération par hydrolyse sulfurique .

Préparation des dérivés acétylés :

1 - 1 g de précipité brut est dissous dans 25 ml d'anhydride acétique, on ajoute 6 gouttes d'acide sulfurique concentré et, après 72 heures à la température du laboratoire, on verse dans l'eau glacée. On recueille le précipité par centrifugation et on le fait sécher (0,93 g) .

Plusieurs essais de purification ont été effectués : précipitation par l'éther de pétrole d'une solution dans l'acétate d'éthyle, cristallisation dans l'alcool à 60° bouillant ; par ce dernier procédé on a obtenu après refroidissement une substance blanche (P.F. instantané 219-220°) .

2 - D'autre part nous avons préparé un dérivé acétylé à partir de la leucoanthocyanidine (0,60 g) traitée à froid par l'anhydride acétique (10ml) et la pyridine (4ml) . Après 48 heures, la liqueur a été versée dans l'eau glacée . On recueille par centrifugation 0,20 g de précipité qui a été purifié par précipitation, au moyen d'éther de pétrole, d'une solution dans l'acétate d'éthyle . Ce produit blanc a pour P.F. instantané: 170° .

Il semble donc différent du premier dérivé, l'acétylation pouvant être plus ou moins poussée suivant le procédé employé . Ayant eu seulement une très petite quantité du dernier produit nous n'avons pu en approfondir l'étude .

Dosage des groupements acétyle du dérivé acétylé :

0,25 g de produit acétylé préparé selon la première méthode et purifié dans un mélange acétate d'éthyle et éther de pétrole, ont été saponifiés avec 3 ml d'alcool à 95° et 3 ml de potasse alcoolique à 30 %, dans un ballon muni d'un réfrigérant ascendant , pendant 1 heure au bain marie bouillant .

La solution refroidie a été acidifiée par 20 ml d'acide phosphorique à 10 % et distillée sur une petite flamme dans un appareil rodé, le tube efférent plongeant dans 10ml d'eau; 20 ml de distillat ont été recueillis; 20 ml d'acide phosphorique à 10 % ont été alors ajoutés dans le ballon et la distillation a été poursuivie pour avoir encore 10 ml de distillat.

Dans les distillats réunis l'acide acétique a été dosé par la potasse 0,1 N en présence de phénol-phtaléine.

Calcul :

Prise d'essai : 0,25 g

KOH alcoolique 0,1 N utilisé: 14,3 ml pour 30 ml de distillat
1 ml KOH 0,1 N 0,0060 CH_3COOH et 0,0043 g CH_3CO

$14,3 \times 0,0043 = 0,051$ g CH_3CO pour la prise d'essai soit
20 pour 100 CH_3CO

calculé pour un dérivé diacétylé 23 p. 100 (pour la substance
calculé pour un dérivé triacétylé 36 p. 100 ($\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$, poids
moléculaire 290)

Le produit obtenu correspond donc à un dérivé diacétylé

Préparation d'un dérivé méthylé :

0,40 g du produit purifié, dissous dans 40 ml d'acétone préalablement déshydratée sur sulfate de sodium sec, sont introduits dans un petit ballon avec 1 ml de sulfate de méthyle et 8g de carbonate de potassium. On chauffe 6 heures au bain marie bouillant en surmontant le ballon d'un réfrigérant à reflux, on filtre chaud et évapore à sec. Le résidu a été lavé par l'eau froide, repris par le méthanol chaud et la solution filtrée.

Par refroidissement, ont été obtenus quelques milligrammes d'un produit, $F = 167^{\circ}$, dont la teneur en méthoxyle est de 26,11 % (calculé pour un dérivé triméthylé : 26,30 %) .

Oxydation périodique :

0,10 g de produit dissous dans 1 ml d'alcool à 96° a été mis en contact avec 10 ml de la solution d'acide périodique 0,1 N .

Au bout d'une demi-heure, on ajoute 25 ml de solution d'anhydride arsénieux 0,1 N dans le bicarbonate de sodium à 10 % et 10 ml d'une solution d'iodure de potassium à 10 %, on laisse une demi-heure . Le produit de la réaction est fortement coloré en brun rouge aussi l'excès d'acide arsénieux a-t-il été titré par une solution d'iode 0,1 N en présence de tétrachlorure de carbone, l'excès d'iode colorant en rose la phase organique : Iode utilisé soit N_1 .

Un essai à blanc a été fait dans les mêmes conditions (Iode utilisé N_2) . $N_1 - N_2 =$ acide périodique 0,1 N consommé par la prise d'essai .

Dans ces conditions nous avons trouvé 0,20 g d'acide périodique consommé par 0,10 g produit . Soit environ 2 molécules d'acide périodique pour une de chromogène, ce qui est en accord avec un flavane-diol (35) (53) .

Réactions de l'anthocyanidine formée à partir du chromogène :

Une solution de leucoanthocyane dans l'acide chlorhydrique 2 N , est chauffée 1 minute au bain marie bouillant . La liqueur est épuisée par l'alcool isocmylique qui se colore en rouge . Cette solution ne vire pas au bleu par addition de la solution alcoolique de chlorure d'aluminium à 1 % . Il ne s'agit

donc pas d'une leucoanthocyanidine ayant 2 OH en ortho (37) (38) (72) (74) .

Par contre la solution dans l'alcool isoamylique devient rouge violet intense par addition de quelques gouttes d'une solution de carbonate de sodium à 20 % .

Etude de l'anthocyanidine formée en chromatographie sur papier :

La solution rouge dans l'alcool isoamylique a été examinée en chromatographie sur papier avec différents solvants : On obtient une seule tache rouge : de Rf 0,80 dans le solvant de FORESTAL (8 heures);

- de Rf 0,68 dans le mélange (m-crésol - HCl 5 N - acide acétique 1 - 1 - 1 - v/v (8) ;

- de Rf 0,73 (butanol, HCl 2 N 1 - 1) (8)

- une tache rouge allongée de Rf 0 - 0,50 dans un mélange d'acide chlorhydrique 3 N , acide formique à 90 % (1 - 1) (6 heures) (ROUX) (75) .

- par chromatographie bidimensionnelle on obtient une tache rouge de Rf 0,75 dans la phase aqueuse de butanol acétique de Partridge (16 heures) et Rf de 0,85 dans la phase organique (16 heures) (RIBEREAU - GAYON) (72) .

Nous n'avons donc pu mettre en évidence qu'une seule anthocyanidine à partir du chromogène brut de départ .

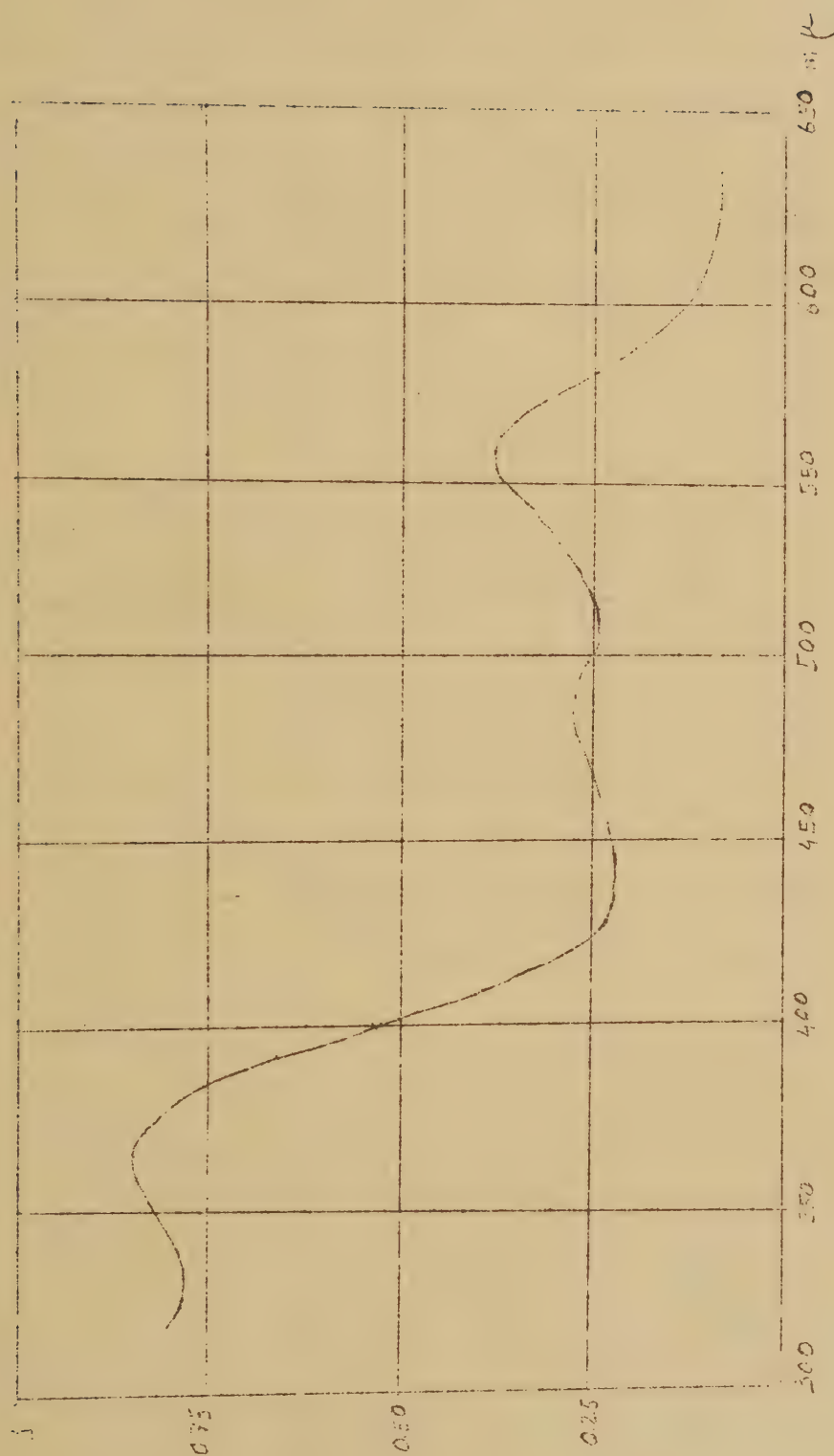


fig 6. Spectre de l'anthocyanidine formé dans l'alcool Chlorhydrique 1 %

Spectre de l'anthocyanidine formée :

Le spectre d'une solution du chromogène de départ dans l'alcool contenant 1 % d'acide chlorhydrique et colorée en rouge violacé par transformation en anthocyanidine montre un minimum à 255 - 260 mμ , un maximum à 280 mμ et, dans le visible, des maximums à 350, 470 et 565 mμ , le dernier correspondant à celui indiqué par DEMOEL (16) pour la coloration obtenue avec les feuilles de Cassia auriculata .(fig. 6) En utilisant l'acide sulfurique nous avons eu les mêmes résultats.

- D'autre part, la coloration rouge obtenue dans le milieu alcool chlorhydrique a été diluée par l'eau et extraite par le butanol . Ce solvant a été évaporé à sec et le résidu repris par l'alcool à 96°. Le spectre effectué sur cette solution a deux maximums à 280 mμ et à 480 mμ .

- une solution colorée du produit dans l'acide chlorhydrique 2 N a été chauffée au bain marie bouillant et le produit rouge de la réaction a été extrait par l'alcool isoamylique . Le spectre a été étudié avec l'appareil graphi spectral JOULIN . Il montre deux maximums dans le visible à 365 et 485 mμ . Les sommets ne se déplacent pas par addition de 2 gouttes de solution alcoolique à 2 % de chlorure d'aluminium à 3 ml de la solution à examiner (GEISSMAN et coll.) Il ne se forme donc pas de complexe avec les ions d'aluminium . D'autre part, la tache allongée de leucoanthocyane obtenue en chromatographie sur papier Arches 302 dans le butanol acétique a été découpée transversalement en cinq, chaque bande de papier étant éluée par l'alcool chlorhydrique à 1 % .

Les éluats ont été chauffés au bain marie bouillant de façon à développer la coloration de l'anthocyanidine . Les spec-

tres dans le visible de ces solutions sont identiques et montrent les mêmes maximums à 350, 470, 565 m μ .

Par cette méthode également on ne peut donc mettre en évidence qu'une seule anthocyanidine .

Fusion alcaline .

Elle a été faite dans un creuset de quartz sur 0,10 g de la leucoanthocyanidine auxquels ont été ajoutés 5 g de pastilles de potasse et 3ml d'eau . Le creuset a été porté dans un four à moufle à 190° trois minutes, puis à 240° 2 minutes (69) (81) .

Après refroidissement, le produit de la réaction est traité par un excès d'acide sulfurique 2 N et la solution acide épuisée par l'éther .

Les fractions phénols et acides-phénols ont été séparées à partir de cet extrait étheré, par épuisement au moyen d'une solution saturée de bicarbonate de sodium qui dissout seulement les acides . La solution bicarbonatée a été acidifiée puis épuisée par l'éther, le résidu d'évaporation de ce solvant a été repris par le méthanol .

L'extrait étheré épuisé par la solution de bicarbonate de sodium et renfermant les phénols a été évaporé également et le résidu repris par le méthanol . Les deux fractions ont été examinées en chromatographie sur papier Arches 302 dans le solvant acide acétique à 2,5 % avec les témoins suivants : acides gallique, protocatéchique, caféique, férulique, salicylique, p-hydroxybenzoïque et pour les phénols : orcinol, hydroquinol, pyrocatéchol, résorcinol, phloroglucinol .

Les révélateurs sont la paranitraniline ou la benzidine

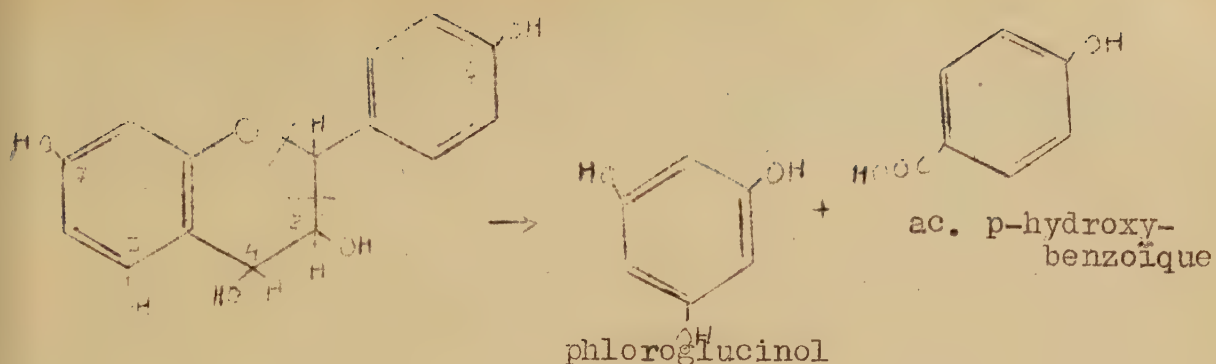
diazotée . Après séchage à l'air libre on pulvérise une solution de carbonate de sodium à 20 % .

Les taches sont indiquées dans le tableau suivant :

Rf Paranitraniline + CO ³ Na ²		Benzidine + CO ³ Na ²	
0,78 orangé	brun	rose orangé	rouge
0,65 o.	rouge	o	rose
0,60 orangé	brun	violet	violet

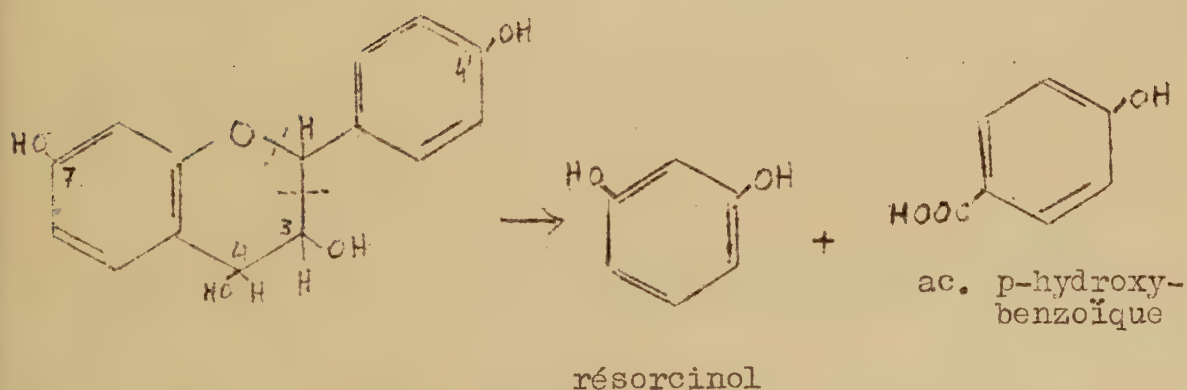
Dans la fraction phénol, les deux taches de Rf 0,78 et 0,60 correspondent respectivement aux témoins de résorcinol et de phloroglucinol, et dans la fraction acide-phénol, on a une seule tache de Rf 0,65 qui correspond à l'acide p-hydroxybenzoïque .

Avec une leucoanthocyanidine purifiée, dans la fraction phénol, la tache correspondant au phloroglucinol est plus intense et dans la fraction acide-phénol on retrouve toujours l'acide p-hydroxybenzoïque . Ces produits peuvent provenir de la dégradation du 5-7-4' -trihydroxyflavane-3-4-diol, selon le schéma :



D'autre part la teneur en méthoxy du dérivé méthylé obtenu précédemment correspond à une leucoanthocyanidine triméthylée .

Un flavane diol trihydroxylé semble surtout présent dans le produit purifié, accompagné d'une petite quantité d'un 7 - 4' - dihydroxyflavane diol dégradé en résorcinol par fusion alcaline .



Un 5-7-4'-trihydroxyflavane-3-4-diol a déjà été isolé de l'Eucalyptus calophylla par GANGULY et SESHADRI (36) et appelé leucopélargonine . Cette substance possède un pouvoir rotatoire lévogyre .

De plus les constantes suivantes sont précisées par les auteurs : dérivé pentaacétylé P.F. = 170°

dérivé triméthylé P.F. = 148-150°

La leucoanthocyanidine principale du C. goratensis semble donc différente de la leucopélargonine, c'est pourquoi nous avons proposé pour elle le nom de goratensidine (63) .

A côté, il paraît exister une substance moins hydroxylée, comme le guibourtacacidine de ROUX (75) , mais nous n'avons pu approfondir cette étude faute de matière première et étant donné les difficultés d'obtention et de purification du chromogène .

En résumé ; Dans les feuilles de Cassia goratensis nous n'avons pas mis en évidence de dérivés anthracéniques, mais une quantité assez importante de tanins catéchiques qui ont été dosés (11,8 %) .

Nous y avons caractérisé une substance chromogénique, donnant une coloration rouge violacé sous l'influence des acides concentrés, et paraissant voisine de celle signalée dans les folioles de Cassia auriculata, dont la structure n'avait pas été étudiée .

L'épuisements par les solvants successifs a permis de séparer le chromogène dans l'extrait étheré. Différents procédés de purification, notamment précipitation fractionnée par l'éther de pétrole et fractionnement sur colonne de silice, ont permis d'obtenir une substance blanche, P.F. 274-275;

de formule brute $C_{15}H_{14}O_6$, $0,5 H_2O$, que ses propriétés physiques et chimiques ont permis de rattacher au groupe des leucoanthocyanes; il ne s'agit pas d'un hétéroside mais d'une leucoanthocyanidine

D'après la chromatographie bidimensionnelle sur papier le produit brut semble constitué par deux substances voisines, mais, sous l'influence des acides, nous avons mis en évidence, (chromatographie sur papier, spectre .) la formation d'une seule anthocyanidine . Des dérivés acétylés ont été préparés, ainsi qu'un dérivé méthylé, qui d'après la teneur en OCH_3 serait triméthylé .

Le produit principal semble être un 5-7-4'-trihydroxyflavane 3-4 diol, (formation de phloroglucinol et d'acide p-hydroxybenzoïque, par fusion alcaline) pour lequel a été proposé le nom de goratensidine . Il est accompagné dans le chromogène brut d'un 7-4' dihydroxyflavane 3-4 diol. (formation de résorcinol et d'acide p-hydroxybenzoïque, par fusion alcaline)

4 - Evaluation colorimétrique du chromogène .

Afin d'évaluer la teneur en chromogène de la plante et des différents extraits préparés, nous avons étudié les divers facteurs influençant la coloration (concentration en acide, temps de chauffage) et alors cherché quelle était sa stabilité et entre quelles limites de concentrations, la loi de BEER LAMBERT était vérifiée .

Nous avons préparé des solutions de leucoanthocyanidine purifiée (obtenue par fractionnement sur colonne de silice bisulfitée) de différentes concentrations : 0,1 ; 0,01 et 0,001% dans l'alcool à 96° .

La coloration a été obtenue par action de l'acide chlorhydrique au bain marie bouillant et les mesures ont été effectuées avec le photocolorimètre ELECTROSYNTHÈSE (Modèle Standard) utilisant l'écran (6), vert jaune Ilford, qui transmet une lumière de longueur d'onde 550 mμ et avec lequel nous avons eu la plus grande absorption de la coloration rouge violet. Par la suite, nous avons utilisé l'électrophotomètre MEUNIER (filtre 550 mμ)

a) Stabilité de la coloration obtenue

Après avoir ajouté 1,5 ml d'acide chlorhydrique à 35 % aux 8,5 ml de solutions alcooliques à différentes concentrations du produit, nous avons essayé d'obtenir la coloration à la température du laboratoire et en chauffant une minute au bain marie bouillant .

Dans le premier cas, la réaction est moins sensible et l'intensité de la coloration croît pendant une durée d'une heure, puis reste stable une demi-heure et diminue lentement .

Dans le cas de chauffage, la réaction est très rapide nous avons tout de suite le maximum d'intensité, mais la densité optique s'affaiblit régulièrement dès le refroidissement. Il est donc important de faire les lectures toujours dans le même temps. Nous avons donc cherché une température de chauffage convenable pour avoir une coloration de même intensité que celle obtenue au bain marie bouillant et restant stable pendant un temps suffisant après refroidissement.

Pour cela, nous avons effectué deux séries d'essais avec 100 mg du produit, 8,5 ml d'alcool, 1,5 ml acide chlorhydrique concentré:

1- Essais à différentes températures (44° , 55° , 80°) réalisés dans un bain marie à température réglable . L'intensité maximale a été cherchée en chauffant continuellement. Elle a été obtenue par chauffage 25 minutes à 44° , 10 minutes à 55° et 4 minutes à 80° (fig. 7) .

Les deux premières intensités sont inférieures à celle obtenue en chauffant une minute au bain marie bouillant, donc ces conditions ne sont pas à retenir .

2- D'autre part, après avoir obtenu l'intensité maximum (à 44° , 55° , et 80°) et avoir refroidi sous un courant d'eau, les variations de densité optique ont été observées, pendant une heure, en faisant les lectures toutes les 10 minutes .

Seule la coloration obtenue par chauffage à 44° reste stable de la vingtième jusqu'à la quarantième minute .

Après chauffage à 55° et surtout à 80° , les colorations s'affaiblissent assez vite. (fig. 8) Il n'y a donc pas avantage à faire les essais à ces températures, moins commodes à réaliser que celle du bain marie bouillant .

Pour tous les essais ultérieurs nous avons chauffé une minute au bain marie bouillant, refroidi rapidement sous un courant d'eau et fait la lecture à la dixième minute après le refroidissement .

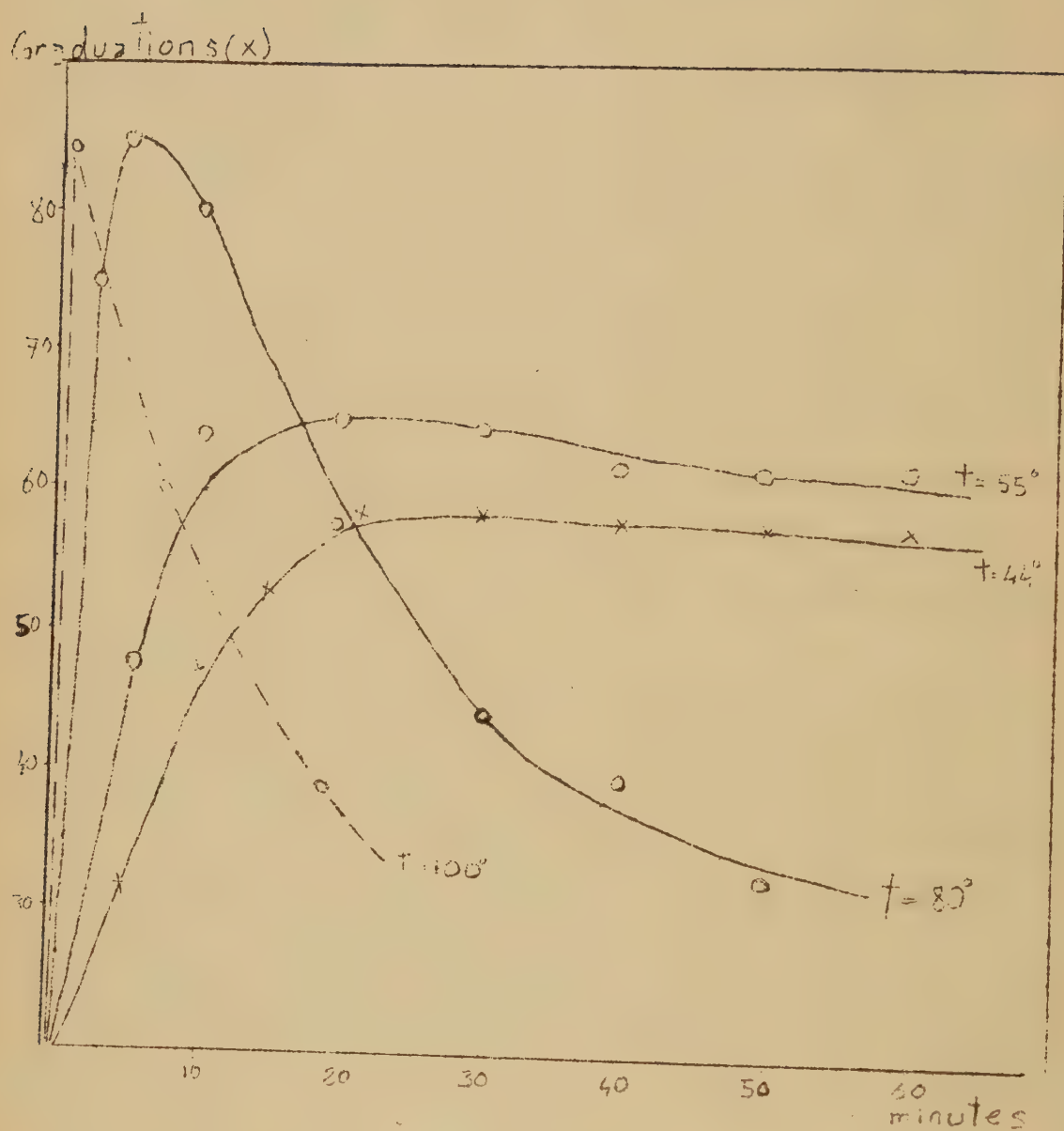


fig. 7 - Variations de l'intensité de la coloration suivant la température et la durée du chauffage .

(x) Les graduations du tambour de spectrophotomètre Meunier .

colorations

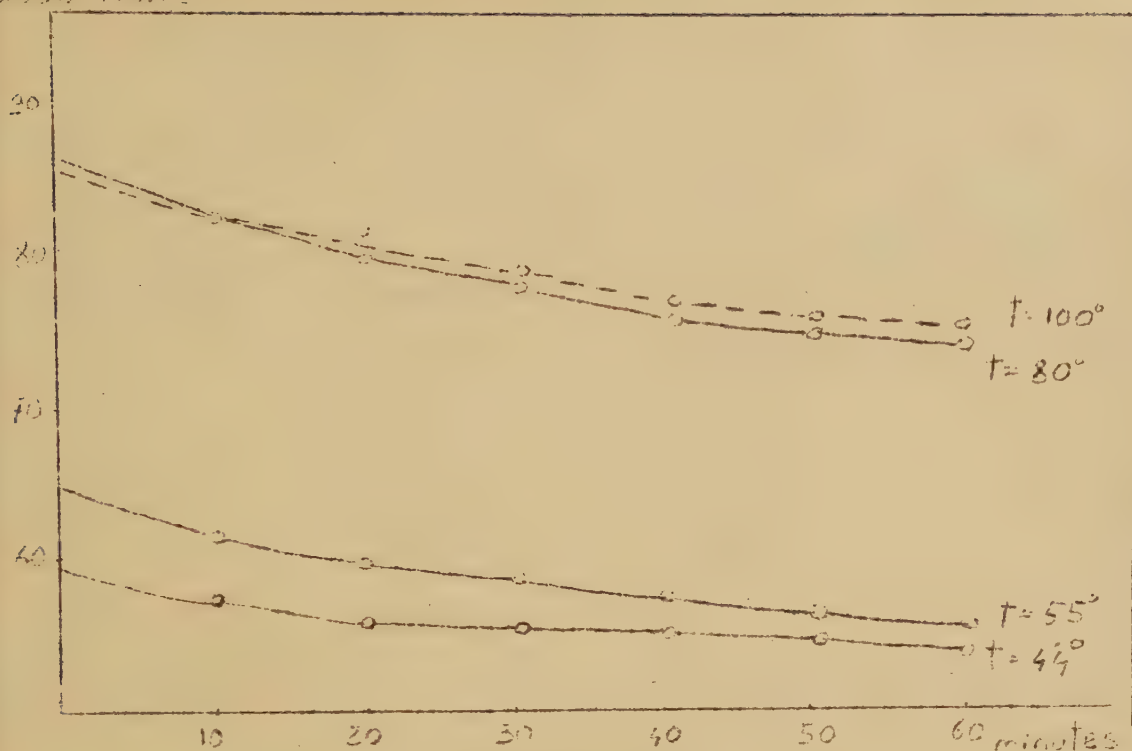


fig.8- Stabilité de la coloration au cours du temps
après refroidissement.

b) Influence de la concentration en acide

En conservant le volume de 10 ml, nous avons augmenté le teneur en acide chlorhydrique concentré. Pour ajuster l'aiguille du photocolorimètre au zéro, on a utilisé un mélange d'alcool à 96° et d'acide chlorhydrique à la concentration des essais correspondants.

La limite de sensibilité a été définie par la plus petite quantité de produit amenant une déviation de l'aiguille du photocolorimètre de 5 divisions. La limite maximale celle donnant une déviation du photocolorimètre de 85 divisions.

D'après les concentrations minimales et maximales nous avons calculé la marge d'utilisation

Concentration en acide chlorhydrique (sol. à 35%) en volumes dans le mélange.	Concentration en substance dans le mélange		Marge d'utilisation conc. max. conc. min.
	minimum	maximum	
5 %	0,0002%	0,0011%	5,5
10%	0,00004%	0,0038%	95
15%	0,00002%	0,0023%	115
20%	0,00002%	0,0015%	75
25%	0,00002%	0,0010%	50

Nous avons conclu qu'avec la concentration de 15 % d'acide chlorhydrique on obtient la plus grande marge d'utilisation.

Pour étudier l'influence du temps du chauffage, nous avons adopté cette concentration en acide.

Influence du temps de chauffage au bain marie bouillant.

Temps en minutes	Concentration en substance dans le mélange		Marge d'utilisation conc. max. conc. min.
	minimum	maximum	
1/2	0,00015	0,003	20
1	0,00002	0,0023	115
2	0,00002	0,0023	115
3	0,00003	0,0023	77
5	0,000035	0,0024	70

Un temps d'une minute a donc été choisi comme durée optimale de chauffage au bain marie bouillant.

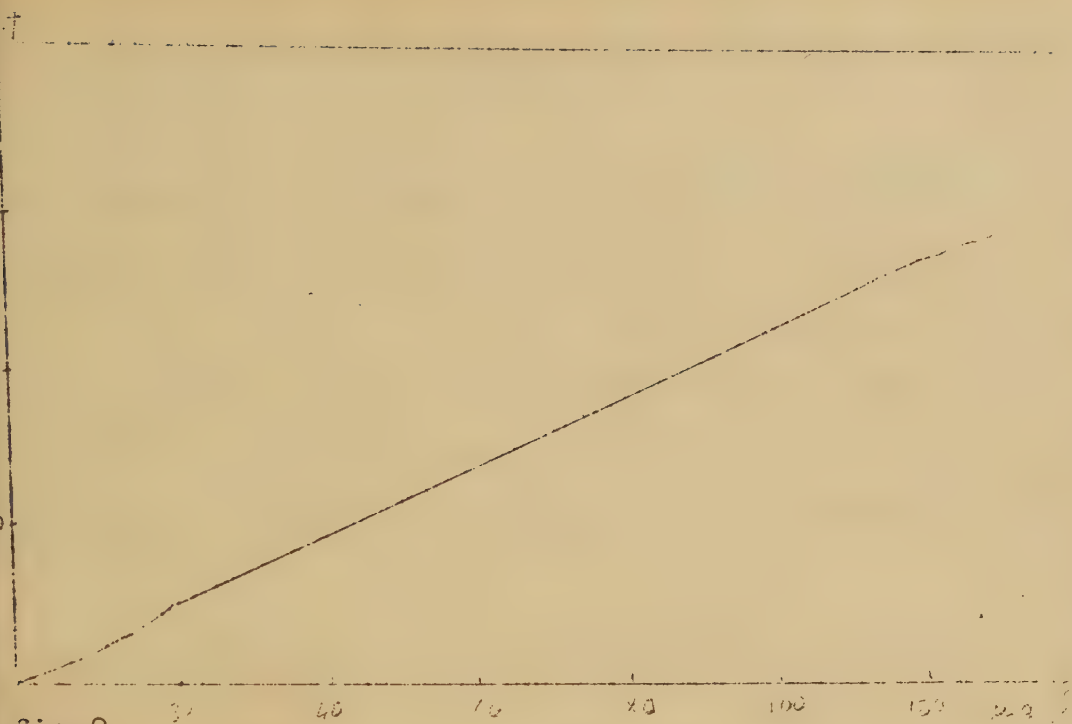


fig.9

Densité optique en fonction de la concentration
en substance chromogénique

Graduations

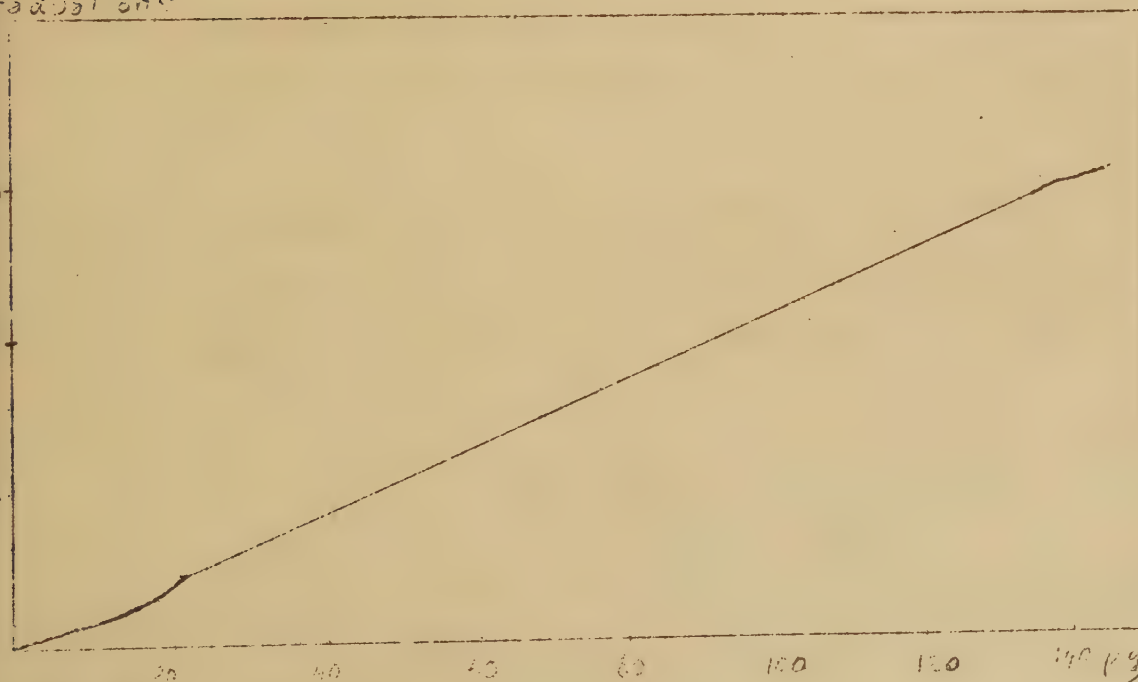


fig.10

140 µg / 1 ml

Influence de la concentration en substance dans les conditions précédentes.

La densité optique est proportionnelle à la concentration de la solution entre 20 et 120 μg de substance pour 10 ml de la solution alcoolique (fig. 9) .

Les mesures ont été effectuées avec l'électrophotomètre MEUNIER en utilisant le filtre 550 . Les résultats sont analogues, la loi de BEER LAMBERT est suivie entre 20 et 140 μg de substance. (fig. 10) .

Application à l'évaluation colorimétrique de la substance chromogénique dans la teinture :

Une teinture de feuilles de C. gorantensis a été préparée au 1/20 dans l'alcool à 96° . Elle a été décolorée par le charbon animal et diluée au 1/1.000 - 1 ml de la teinture au 1/1.000 a été additionné de 7,5 ml d'alcool 96° et de 1,5 ml d'acide chlorhydrique concentré, le tout chauffé une minute au bain marie bouillant, refroidi rapidement, la lecture étant faite à la 10^e minute.

La teinture au 1/10.000 n'a pas de coloration sensible, donc comme mélange témoin pour ajuster le colorimètre, nous avons pris 8,5 ml d'alcool 96° additionnés de 1,5 ml d'HCl concentré.

Résultats :	1 ml teinture transmission	: 62
	densité optique	: 0,32
d'après la courbe(1) nous trouvons		: 69 μg de chromogène dans la prise d'essai qui correspond à 1 mg de plante.
La teneur dans 100 g de plante est donc		: 6,9 %

Dans les mêmes conditions, avec la teinture de C.auri-
culata, nous avons dosé 7,4 g de la substance chromogénique pour
100 g de plante.

Ces valeurs semblent très élevées mais il semble que
la leucoanthocyanidine ne soit pas seule responsable de la colo-
ration rouge produite en milieu acide et chaud, et que les
catéchines présentes dans la teinture, interviennent également.

B - Etude des Gousses . (Péricarpes)

Des essais ont été effectués, d'une part sur le péricarpe charnu, d'autre part sur les graines.

Péricarpe .

Teneur en eau	9,44 %
---------------	--------

Cendres totales	4,51 %
-----------------	--------

L'infusé à 2 %, de coloration jaune orangé, se colore en verdâtre par le chlorure ferrique dilué.

Il donne un louche par le réactif de Stiasny, par ébullition avec l'acide chlorhydrique dilué il se colore en rose et il apparait un léger précipité . Ces réactions sont en faveur d'une petite quantité de tanins catéchiques.

Par ailleurs la réaction de la cyanadine est positive (coloration rose), indiquant la présence de flavonoïdes.

Recherche des dérivés anthracéniques .

L'infusé additionné d'acide sulfurique pour avoir une concentration de 10 % d'acide, est porté à l'ébullition 5 minutes. Après refroidissement on épuise par le benzène. Celui-ci est agité avec l'ammoniaque à 10 % qui se colore en rose. Il existe donc des dérivés anthracéniques.

Etude en chromatographie sur papier.

Méthode ascendante - Papier Arches 301 - Tinture au 1/5 concentrée au 1/2. Taches de 10 μ l. Solvant de PARTRIDGE . On observe les taches suivantes :

-à Rf 0,25, une tache jaune faible dans le visible, en lumière

.V., après potasse, borate de sodium, alun de potasse et acé-
ate de magnésium.

-à Rf 0,70, une tache plus importante à fluorescence jaune in-
ense non modifiée par les réactifs précédents. Le chlorure fer-
ique ne donne pas de coloration.

-à Rf 0,88 une tache rose dans le visible et après potasse pa-
aissant correspondre à un dérivé anthraquinonique libre.

La révélation par les vapeurs d'acide chlorhydrique ne
permet pas de mettre en évidence de leucoanthocyane comme dans
les feuilles. La recherche directe sur la poudre et la teinture
est également négative.

Dosage des dérivés anthracéniques. Ils ont été dosés par les
méthodes précédemment décrites.

I/ Méthode voisine de celle de FAIRBAIRN¹ (25) à partir de
l'infusé, hydrolyse chlorhydrique simple.

-Dérivés libres	: 0,04 %
-Dérivés combinés acides	: 0,225 %

(Mais la coloration de la solution alcaline est jaune
orangé et ne se modifie pas par oxydation à l'air.)

-Autres dérivés - La liqueur alcaline est colorée en jaune
même après oxydation à l'air. Il ne peut donc pas s'agir d'an-
thraquinones.

Pensant avoir affaire à un dérivé réduit, nous avons
essayé d'autres procédés d'hydrolyse.

II/ Hydrolyse oxydante .

a) en présence d'eau oxygénée selon la méthode de
FAIRBAIRN et MAHRAN pour le Cascara. (24)

200 ml d'infusé sont additionnés de 12 ml d'eau oxygénée

à 6 % et de 16 ml d'acide sulfurique 10 N; après ébullition 15 minutes au bain-marie bouillant, on épuise par l'éther et termine le dosage selon le procédé habituel.

Dérivés acides: la liqueur alcaline est colorée en rose.

Le dosage colorimétrique correspond à 0,035 % de dérivés anthracéniques (chiffre plus faible que précédemment, mais la teinte est rose).

Autres dérivés (on obtient également une teinte rose) : 0,012 % .

b) en présence de chlorure ferrique selon la méthode employée par FAIRBAIRN et MITAL pour hydrolyser la substance analogue à l'aloïne du Rhamnus purshiana. (26)

20 ml d'infusé ont été additionné de 8 ml d'acide chlorhydrique concentré et de 3 g de chlorure ferrique cristallisé; après 15 minutes au bain marie bouillant la liqueur est épuisée par le chloroforme. L'épuisement est très long pour obtenir la décoloration des liqueurs chloroformiques. Celles-ci sont agitées avec la solution saturée de bicarbonate de sodium, après acidification, passage des dérivés acides en solution étherée, puis épuisement par la potasse normale, le dosage colorimétrique est effectué. La liqueur alcaline est colorée en rose, le dosage colorimétrique correspond à 0,225 % de dérivés acides. Après oxydation de la liqueur alcaline par l'eau oxygénée le chiffre obtenu est plus faible.

Les autres dérivés sont présents en quantité très faible: 0,037 % (la liqueur alcaline doit être oxydée par l'eau oxygénée pour prendre une teinte rose).

L'hydrolyse oxydante semble donc provoquer l'oxydation de dérivés réduits puisque la liqueur alcaline servant au dosage colorimétrique est alors colorée en rose. Mais la teneur en dérivés anthracéniques reste assez faible.

III/ A partir de la poudre : Méthode d'AUTERHOFF (hydrolyse acétique et chlorhydrique).

-Dérivés acides. La liqueur alcaline est colorée jaune, même après oxydation. La teneur élevée trouvée 0,92 % ne correspond donc pas seulement à des dérivés anthracéniques.

-Autres dérivés. La liqueur alcaline est brun orangé.

Trouvé: 0,70 % si l'on se rapporte à la courbe, mais on peut faire la même observation que précédemment.

Essai de séparation des dérivés anthracéniques.

Dans l'espoir d'isoler les dérivés anthracéniques précédemment caractérisés, des épuisements ont été effectués sur le péricarpe.

1) Epuisement par l'alcool à 96° . Dans un ballon muni d'un réfrigérant à reflux, 300 g de péricarpes écrasés sont traités à trois reprises par 1,5 litre d'alcool bouillant, l'ébullition étant prolongée pendant 1 heure; une petite quantité d'extract a été concentrée par distillation de façon à avoir une liqueur dont 1 ml corresponde à 1 g de plante.

Cette solution présente les mêmes taches en chromatographie sur papier que la teinture.

Une autre partie correspondant à 50 g de plante a été concentrée à consistance sirupeuse et l'extract épuisé dans un ballon muni d'un réfrigérant à reflux, par l'acétate d'éthyle

(3 épuisements), puis par l'acétone.

Les liqueurs d'acétate d'éthyle ont été concentrées à sec et l'extrait examiné en chromatographie sur papier donne les taches suivantes dans ces conditions: Papier Arches 302 - mélange: alcool isoamylique, hexane, acide acétique, eau (3-1-3-3)

Rf 0,60: tache jaune dans le visible, après potasse, borate de sodium, acétate de magnésium et alun de potassium; verdâtre jaune aux U.V.

Rf 0,80: tache jaune dans le visible de fluorescence jaune après les réactifs précédents.

Rf 0,98: tache jaune dans le visible, rose après potasse, borate de sodium, acétate de magnésium.

La réaction de la cyanidine est positive pour ces deux extraits et la tache de Rf 0,60 pourrait être un dérivé flavonique.

1 g d'extrait sec d'acétate d'éthyle a été hydrolysé par 100 ml d'acide sulfurique N au bain marie bouillant pendant 4 heures. La liqueur d'hydrolyse a été épuisée par le chloroforme, l'éther, puis l'acétate d'éthyle, pour obtenir les génines. Chacun de ces extraits a été examiné en chromatographie sur papier dans les conditions précédentes.

L'extrait chloroformique ne donne qu'une tache, de Rf 0,96, rouge violacé après potasse. Mais sur chromatoplaque de gel de silice on obtient 2 taches de Rf correspondant au chrysophanol et à l'émodol.

Les extraits étheré et acétate d'éthyle donnent une seule tache orangée après potasse, Rf 0,80.

D'autre part, la réaction de la cyanidine est négative.

Il s'agirait peut être d'un anthranol.

Aussi une nouvelle hydrolyse a-t-elle été effectuée en présence d'un oxydant (chlorure ferrique) : l'extrait sec d'acétate d'éthyle en solution à 2 % dans HCl 3 N renfermant 25 % de chlorure ferrique, a été chauffé 15 minutes au bain marie bouillant.

La liqueur d'épuisement chloroformique renferme des génines anthraquinoniques comme précédemment. Elle donne une seule tache en chromatographie sur papier dans le butanol acétique, mais 2 taches sur chromatoplaque dans le mélange acétate d'éthyle 20 - hexane 80, correspondant à l'émодол et au chrysophanol.

La liqueur d'épuisement par l'éther donne 2 taches:

- Rf 0,86 jaune dans le visible et aux U.V., jaune orangé après borate, devenant rose à la longue dans le visible, rose rouge après acétate de magnésium, jaune après alun de potassium.

Il s'agit donc vraisemblablement d'un anthranol.

- Rf 0,97: tache de génine anthraquinonique, rouge après potasse.

La liqueur chloroformique a été évaporée a sec, le résidu (0,125 g) a été mêlé à un peu de silice et placé sur une colonne de silice de 25 g imbibée de pétrole. L'élution a été effectuée par de l'éther de pétrole renfermant des quantités croissantes d'acétate d'éthyle (10 - 20 - 30 %) .

Dans les premiers 15 ml, est éluee une substance de Rf 0,98 sur papier Whatman 1, dans le toluène saturé d'eau préconisé par FAIRBAIRN pour les génines anthracéniques, se comportant donc comme le chrysophanol; de même sur plaque de silice (acétate d'éthyle 20 ; hexane 80) on a une seule tache de même

me Rf que le chrysophanol. Cependant le spectre U.V. de la substance en solution dans l'alcool à 96° examiné avec le spectrophomètre UNICAM S.P. 500 présente un premier maximum à 275 mμ, un deuxième à 430 mμ et un minimum à 265 mμ, alors que le chrysophanol présente 3 maximums à 255, 285 et 430 mμ et 2 minimums à 235 et 275 mμ.

Les 120 ml suivants, colorés en jaune, renferment une substance anthraquinonique ne donnant qu'une tache sur papier Whatman N°1 dans le toluène saturé d'eau de Rf 0,65 correspondant à celui de l'émodol. Le déplacement sur plaque de silice est également celui de l'émodol. La substance a été obtenue à l'état cristallisé dans de l'eau additionnée d'une quantité suffisante d'acide acétique pur pour la dissoudre (à chaud) ; par refroidissement se séparent des cristaux prismatiques jaune orangé, P.F. 248-249° (Bloc Maquenne) .

Le spectre U.V. est également concordant: maximums à 290 et 440 mμ et minimums à 235 - 275 mμ, une dépression entre 330 et 380 mμ.

En résumé, nous avons caractérisé dans le péricarpe des gousses de Cassia gorantensis Fresen, en dehors de traces de tanins catéchiques et de dérivés flavoniques, une petite quantité de dérivés anthracéniques. Il n'existe que des traces d'anthraquinones libres (0,04 %). Les dérivés combinés sont présents sous forme réduite. L'hydrolyse acide oxydante, effectuée notamment en présence d'eau oxygénée et surtout de chlorure ferrique, a permis d'évaluer 0,22 g% de dérivés anthracéniques exprimés en sennosides.

Les génines anthraquinoniques totales ont été séparées

le l'extrait d'acétate d'éthyle après hydrolyse acide en présence de chlorure ferrique puis épuisement par le chloroforme.

Le fractionnement sur colonne d'acide silicique a permis d'isoler de l'émodol cristallisé par son point de fusion, son Rf en chromatographie sur papier et sur plaque et son spectre U.V.

Une substance de même Rf que le chrysophanol, mais en différant par son spectre ultraviolet, a été aussi séparée.

C - Etude des Graines .Essais préliminaires.

Teneur en eau 9 %

Cendres totales 3,9 %

Recherche de dérivés anthracéniques :

La réaction de BORNTRAGER (voir p.45) fournit une coloration rose pâle dans la couche ammoniacale, indiquant la présence de dérivés anthracéniques.

Dosage de dérivés anthracéniques :

Le dosage a été effectué, d'une part sur l'infusé, d'autre part sur la poudre.

1) Résultats par la méthode de FAIRBAIRN modifiée.

Dérivés libres oxydés	: 0,064 % g	(La potasse est colorée en rose violet)
Dérivés libres réduits	: 0,024 % g	
Dérivés acides combinés	: 0,14 % g	

Après oxydation au bain marie la liqueur alcaline jaune prend une teinte rose.

Dérivés combinés non acides : 0,05 % g

La coloration violette de la liqueur alcaline s'intensifie légèrement après oxydation.

2) Par la méthode d' AUTERHOFF :

Dérivés acides combinés : 0,27 % g (en sennosides).

La liqueur est colorée en rose, teinte qui ne s'intensifie que légèrement après oxydation.

Autres dérivés : 0,36 g (en istizine)

Ce dernier chiffre très élevé est surprenant au regard
des résultats obtenus par la méthode de FAIRBAIRN modifiée.

noter que la coloration de la liqueur alcaline est franchement
violette mais non rose-violacé comme pour les sennosides. Il
existe donc dans ces graines une quantité importante de dérivés
ne passant pas dans l'infusé, mais extraits par l'acide acéti-
que et l'éther, hydrolysés dans ces conditions et libérant des
génines se colorant en violet en milieu alcalin.

Recherche sur l'infusé à 2 % :

L'infusé à 2 % est de teinte rouge brunâtre.

Recherche des dérivés flavoniques : la réaction de la cyanidine
est négative indiquant l'absence de dérivés flavoniques.

Recherche des tanins : l'addition de quelques gouttes de chloru-
re ferrique à 2 % provoque une coloration brun verdâtre.

L'infusé se colore en rose par ébullition avec l'acide
chlorhydrique. Le réactif de STIASNY ne donne aucun précipité.

Il n'existe donc pas de tanins catéchiques.

Etude en chromatographie sur papier d'une teinture au demi .

Sur papier Arches 302 dans le solvant de PARTRIDGE
nous avons les taches indiquées dans le tableau suivant:

	: KOH		: Bor. Na		: Alun K		: Acé. Mg			
Rf	V.	U.V.:	V.	U.V.:	V.	U.V.:	V.	U.V.:		
0,98:	o	g	ro	b	b	o	b	o	ro	b
0,90:	ro	o	ro	b	b	b	b	b	ro	b
0,80:	ro	o	ro	b	b	b	b	b	ro	b

0,65	ro	o	ro	b	b	b	b	ro	b
0,50	ro	g	b	b	b	b	b	ro	b
0,35	ro	bl	b	b	b	b	b	ro	b
0,25	ro	bl	b	b	b	b	b	ro	b
0,15	ro	j	j	j	j	j	j	j	j

o = orange
g = gris
b = brun
j = jaune
ro = rose
bl = bleu

Avec le chlorure ferrique une tache

verdâtre de Rf 0,15 apparait, puis une
longue traînée brune fait la longueur

du chromatogramme.

Les taches de Rf 0,98 , 0,90 , 0,80 , 0,65 , 0,50 , semblent
correspondre aux dérivés anthracéniques, celle de Rf 0,15 à un
dérivé flavonique.

Essais d'extraction des dérivés anthracéniques.

Nous en avons tenté l'extraction de 70 g de graines
pulvérisées par épuisements successifs par différents solvants
dans un appareil de Soxhlet.

L'extrait sec a été déterminé sur une portion aliquote
pour chaque solvant et des chromatographies sur papier ont été
faites après reprise du résidu par l'alcool méthylique.

Ces extractions sont très longues, plusieurs épuise-
ments de 4 heures ont été effectués avec chaque solvant, chacun
d'eux étant employé jusqu'à décoloration.

	Nombre d'extractions de 4 heures	Extrait sec ‰
Ether de pétrole	3	5,87
Benzène	5	0,90
Ether	2	0,30
Chloroforme	9	1,32
Acétate d'éthyle	9	2,11
Acétone	8	1,99
Alcool	8	8,04

La réaction de Bornträger est légèrement positive pour l'extrait éthéro-pétrolique, plus intense pour ceux obtenus avec les autres solvants, surtout le chloroforme, l'acétate d'éthyle, l'acétone et l'alcool.

En chromatographie sur papier, dans le mélange de Partridge ou le solvant alcool amylique - pyridine - eau (3 - 2 - 1,5); on obtient seulement des ~~trainées~~ ~~rougeâtres~~.

Par concentration des solvants, nous n'avons pas obtenu de précipité avec le benzène, l'éther, le chloroforme. Ce dernier solvant, additionné de plusieurs volumes d'éther a donné un précipité qui s'est résinifié.

L'extrait acétate d'éthyle concentré a fourni un précipité rougeâtre donnant une réaction de Bornträger positive.

Dans l'espoir de caractériser au moins les génines des dérivés anthracéniques, des hydrolyses ont été effectuées sur les extraits secs de l'acétone et de l'alcool.

Ces hydrolyses ont porté sur 0,45 g de chaque extrait, traités d'une part par l'acide chlorhydrique 3 N pendant 20 minutes au bain marie bouillant, d'autre part par le mélange aci-

de acétique, acide chlorhydrique préconisé par AUTERHOFF et dans les proportions données par cet auteur. (5)

Les liqueurs d'hydrolyse ont été épuisées par l'éther. Le solvant évaporé laisse, dans tous les cas, un résidu rougeâtre qui a été soumis à la chromatographie sur plaque dans le solvant éther de pétrole 80, acétate d'éthyle 20, pour identifier les génines.

Dans tous les cas on obtient plusieurs taches, une de R_f faible comme celui de la rhéine, deux correspondent sensiblement à l'émodol et au chrysophanol.

L'extrait étheré de la première hydrolyse a été soumis à la chromatographie sur colonne de silice, suivant la méthode déjà décrite. (voir p.102)

L'élution a été faite par l'éther de pétrole, seul puis additionné de quantités croissantes d'acétate d'éthyle. Trois fractions ont été séparées. Dans l'éther de pétrole renfermant 10 % d'acétate d'éthyle passent successivement trois substances: les deux premières se déplacent sur plaque comme le chrysophanol mais ont des spectres ultraviolets très différents.

Pour la première, absorption à 230 $m\mu$, minimum à 245 $m\mu$, maximum à 265 et puis une chute continue de l'absorption.

Alors que celui du chrysophanol a trois maximums à 255-285 et 430 $m\mu$ et deux minimums à 235 et 275 $m\mu$.

Spectre de la deuxième substance: décroissance de l'absorption de 240 à 280 $m\mu$, inflexion à 285 $m\mu$, puis minimum à 320 et maximum net à 430 $m\mu$.

La troisième substance se déplace comme l'émodol sur

laque (solvant: hexane 20 - acétate d'éthyle 80) et sur papier Whatman N°1 (solvant toluène saturé d'eau FAIRBAIRN (10)).

Des traces de produit cristallisé ont été obtenues, dans l'eau additionnée d'une quantité suffisante d'acide acétique pour dissoudre la substance à la température du bain marie bouillant.

Le spectre ultraviolet de cette substance cristallisée déterminé sur une solution dans l'alcool à 95° présente trois maximums à 255, 285 et 440 mμ et deux minimums à 235 et 275 et une dépression entre 330 et 380 mμ.

Ce spectre concorde exactement avec celui de l'émodol.

En résumé: les graines de Cassia goratensis Fresen renferment, à côté de traces de tanins, des dérivés anthracéniques dont la séparation a été tentée.

Des traces d'émodol ont été isolées à l'état cristallisé dans l'extrait acétonique, après hydrolyse acide, épuisement par l'éther et fractionnement sur colonne de silice.

Il a été identifié par son Rf en chromatographie sur papier et sur plaque et par son spectre ultraviolet par rapport à un échantillon de référence.

Nous n'avons pu caractériser de dérivés flavoniques ni de leucoanthocyane.

Chapitre IV

ETUDE DU CASSIA AREREH DELILE

Nous avons étudié des échantillons de feuilles et des gousses provenant du Cameroun (région de Mogodé) et récoltés en 1959 et 1960 par les services des Eaux et Forêts.

I - Etude des feuilles .

	1 ^{er} échantillon	2 ^{ème} échantillon
Teneur en eau	7,21 %	6,5 %
Cendres totales	12,6 %	7,8 %

Recherche sur l'infusé à 2 %

Le chlorure ferrique en solution aqueuse diluée donne une coloration vert foncé.

L'acide chlorhydrique concentré ne donne qu'une coloration jaunâtre à l'ébullition.

Le réactif de Stiasny (formol chlorhydrique) provoque la formation d'un léger précipité rougeâtre: présence de tanins catéchiques. Le filtrat, saturé d'acétate de sodium, donne une coloration rouge et non bleue après addition de chlorure ferrique (absence de tanins galliques) .

La réaction de la cyanadine est négative, mais, avec un infusé plus concentré (10 %) on obtient une coloration orangée indiquant la présence de traces de dérivés flavoniques.

Recherche des dérivés anthracéniques.

Elle a été effectuée par la méthode indiquée pour l'es-

ai des Sénés à la 8^e édition de la Pharmacopée française.

0,20 g de poudre sont additionnés de 10 ml d'acide sulfurique environ 2 N, on fait bouillir pendant 5 minutes, on filtre à chaud et on épuise le filtrat refroidi par 2ml de benzène. Le benzène séparé est agité avec son volume d'ammoniaque diluée, on obtient une coloration rose, après chauffage de la solution aqueuse quelques minutes au bain marie bouillant la teinte s'intensifie.

Il existe donc des dérivés anthracéniques dans les folioles de Cassia arareh Del.

Etude en chromatographie sur papier.

Une teinture au demi (2 ml = 1 g de plante) a été examinée en chromatographie sur papier Arches 302 avec le butanol acétique, par la méthode ascendante. Comme révélateurs, ont été employés: la lumière ultraviolette, la potasse alcoolique, le borate de sodium, l'acétate de magnésium, l'alun de potassium et le chlorure ferrique.

On observe les taches suivantes:

- à Rf 0,62 une tache jaune dans le visible et en lumière ultraviolette, restant jaune et s'intensifiant après potasse, borate de sodium et acétate de magnésium. Tant dans le visible qu'en lumière de Wood, elle devient verte après chlorure ferrique.

- à Rf 0,78 une tache jaune moins intense dans le visible, en lumière de Wood, à fluorescence verte après alun de potassium.

- à Rf 0,90 une tache jaune dans le visible et aux U.V., devenant rouge après potasse, rose après borate de sodium et acétate

de magnésium.

Cette dernière tache correspond à un dérivé anthraquinonique libre, la tache de Rf 0,62 paraissant plutôt correspondre à un anthranol.

On note, en outre, 3 taches à fluorescence bleue, uniquement visibles en lumière de Wood de Rf 0,25 et 0,85.

Une teinture témoin de feuilles de Cassia angustifolia examinée par comparaison présente deux taches de Rf 0,30 et 0,42 jaunes dans le visible, grises aux U.V. et jaune intense après potasse, borate de sodium, alun de potassium et acétate de magnésium.

- Une tache jaune moins intense, de Rf 0,58, jaune orangé aux U.V., s'intensifiant après potasse, une tache bleue en lumière ultraviolette de Rf 0,70 ; et une tache d'anthraquinone libre de Rf 0,92.

A noter que les sennosides purs A et B, donnent respectivement des taches de Rf 0,50 et 0,38, jaunes dans le visible, brunâtres en lumière ultraviolette.

La teinture de Cassia acutifolia donne sensiblement les mêmes résultats que celle de Cassia angustifolia. Avec celle de Cassia obovata, la tache de Rf 0,58, orangée aux U.V. fait défaut, on trouve seulement 4 taches jaunes de Rf 0,30 - 0,45, 0,60 et 0,80 et une tache d'anthraquinone libre de Rf 0,92.

Dosage des dérivés anthracéniques :

I - Sur l'infusé à 1 %. (voir page 46)

Les dérivés libres sont relativement abondants : 0,190g pour 100 g de feuilles.

dérivés combinés acides (après hydrolyse chlorhydrique):

avant l'oxydation la teinte de la liqueur alcaline est jaune.

l'oxydation simple à l'air par agitation donne une teinte rose correspondant à 0,418 g de dérivés anthracéniques exprimés en sennosides pour 100 g de feuilles.

L'addition d'eau oxygénée (0,2 ml d'une solution à 3 % pour 10 ml de liqueur alcaline), donne une teinte plus rose mais, si on se rapporte à la courbe, des résultats plus faibles sont obtenus: 0,312 g % .

Les autres dérivés sont présents en très faible quantité (teinte de la liqueur alcaline très faiblement jaune).

II - A partir de la poudre privée des dérivés libres :

Hydrolyse par le mélange acide chlorhydrique, acide acétique selon la méthode d'AUTERHOFF. (Voir p.49)

Dérivés acides: La liqueur alcaline jaunâtre devient par oxydation à l'air jaune orangé. Le dosage colorimétrique donne une teneur en dérivés anthracéniques correspondant à 1,39 g exprimés en sennosides. Mais les chiffres obtenus ne sont guère variables malgré l'emploi d'un filtre sélectif pour le dosage, puisque la teinte est orangée et non rose violacé.

Autres dérivés: La liqueur alcaline jaune, reste jaune après oxydation à l'air. Il n'est donc pas possible de donner une valeur pour ces dérivés anthracéniques qui semblent présents en quantité.

Les feuilles de Cassia arereh renferment donc une petite quantité de dérivés anthracéniques libres et une plus importante de dérivés anthracéniques réduits et acides. Nous ..

avons essayé de séparer ces derniers par la méthode employée par STOLL et coll. pour la préparation des sennosides. (83)

1) - Les dérivés libres ont été extraits à partir de 250 g de feuilles, par lixiviation au moyen du chloroforme renfermant 7 % d'alcool à 96°.

Les solutions extractives concentrées à 150 ml donnent une réaction de BORTRAGER intense. Elles sont additionnées de 450 ml d'éther et épuisées par la solution saturée de bicarbonate de sodium ; les solutions bicarbonatées sont neutralisées par l'acide chlorhydrique puis épuisées par l'éther. Par évaporation de l'éther on obtient une substance pâteuse rouge brique que nous n'avons pas réussi à faire cristalliser dans la pyridine.

Une solution saturée dans l'alcool méthylique a été préparée.

En chromatographie ascendante sur papier Arches 302 avec le solvant butanol saturé d'eau, on obtient une seule tache jaune dans le visible, rouge après potasse alcoolique, de Rf 0,58.

Dans le mélange butanol - méthanol - eau 5 - 2 - 2 le Rf est 0,78. Ces chiffres sont identiques à ceux donnés par un témoin de rhéine pure.

Par la technique des chromatoplaques sur gel de silice avec comme solvant le mélange hexane, acétate d'éthyle (80-20) on obtient, après 1/2 heure à 20°, une seule tache de Rf 0,18, identique à celui de la rhéine dans les mêmes conditions.

D'autre part le spectre de la substance isolée, déterminé avec le spectrophotomètre UNICAM S.P. 500 en solution au 1/50.000 dans l'alcool à 96°, présente 3 maximums à 230, 260 et 430 mμ, un minimum net à 240 mμ et une dépression entre 310 et

0 ml. Ce spectre est tout à fait comparable à celui de la rhéine pure.

Il existe donc de la rhéine libre dans les feuilles de Cassia arereh.

2) - Les dérivés combinés .

Le marc a été lixivié par 6 litres d'alcool méthylique renfermant 1,25 g d'acide oxalique par litre. La concentration à 100 ml sous pression réduite n'amène pas de précipitation (le sennoside A précipite dans ces conditions).

La solution a été additionnée de 50 ml d'une solution de chlorure de calcium à 1%, puis d'ammoniaque méthanolique à 5 % ajoutée goutte à goutte jusqu'à neutralité au bleu de bromothymol.

Le précipité obtenu est recueilli, lavé à l'alcool méthylique, séché. Dans le cas de Cassia angustifolia, il renferme de l'oxalate de calcium et le sel de calcium du sennoside B.

Pour libérer ce dernier on ajoute à la suspension du précipité dans 25 ml d'eau, une solution d'acide oxalique (1 g dans 10 ml d'alcool méthylique) jusqu'à réaction acide au rouge congo.

Puis on dilue à 250 ml avec de l'alcool méthylique. Nous avons opéré de même avec le précipité du Cassia arereh, puis avons filtré pour séparer l'oxalate de calcium et le filtrat a été concentré sous vide jusqu'à 35 ml. Aucun précipité ne s'est produit au réfrigérateur.

Après épuisement de la liqueur par le chloroforme et évaporation du solvant, on a obtenu un faible résidu présentant en chromatographie sur papier et sur plaque les caractères de la rhéine.

La liqueur aqueuse donne en chromatographie sur papier

(butanol acétique de PARTRIDGE) les mêmes taches que la teinture mais plus intenses, à l'exception de celle de Rf 0,90 correspondant à la rhéine qui a disparu. Par la réaction de la cyanidine on obtient une coloration orangé clair de la solution.

Sur cette liqueur a été effectué un essai d'hydrolyse. L'acide sulfurique a été ajouté en quantité suffisante pour obtenir une solution 5 N et le liquide a été chauffé au bain marie bouillant 30 minutes.

Après refroidissement, la liqueur a été épuisée par l'éther et le résidu d'évaporation soumis à la chromatographie sur papier. On obtient une seule tache allongée dans le mélange de PARTRIDGE, de Rf 0,90 comme la rhéine, mais jaune aux U.V. et brune après potasse.

Dans le même solvant mais avec un papier imprégné d'une solution aqueuse saturée de borate de sodium, la rhéine pure donne une tache de Rf 0,68. Avec la substance provenant de l'hydrolyse acide précédente on a plusieurs taches: une correspondant à la rhéine, accompagnée des taches fluorescentes blueues de Rf 0,55 et 0,70, et d'une fluorescence jaune de Rf 0,95.

La technique de STOLL et coll. n'ayant en fin de compte permis de caractériser chez Cassia arereh que la rhéine libre, d'autres essais ont été effectués sur la poudre et sur l'infusé, privés de dérivés libres par lavage au chloroforme renfermant 7 % d'alcool à 96° et hydrolysés par les deux méthodes décrites précédemment. (voir p.46 et 49)

Les dérivés acides ont été séparés à partir de l'éther par leur solubilité dans la solution de bicarbonate de sodium,

uis obtenus en solution étherée après acidification.

La chromatographie sur papier non traité et sur papier imprégné de borate de sodium montre qu'il s'agit de rhéine quelque soit le mode d'hydrolyse.

Les autres dérivés sont restés dans l'éther; cette liqueur concentrée soumise à la chromatographie sur papier, donne dans le mélange de Partridge deux taches nettes de Rf 0,74 et 0,90 de fluorescence jaune brillant en lumière ultraviolette et jaune dans le visible après potasse, verte après chlorure ferrique.

Il ne semble donc pas qu'il s'agisse de dérivés anthracéniques, mais plutôt de flavonoïdes puisque la réaction de la cyanidine donne une coloration rose orangé passant complètement dans l'alcool isoamylique.

En résumé: Les feuilles de Cassia arereh Del. renferment une petite quantité de tanins catéchiques, de dérivés flavoniques et des dérivés anthracéniques; parmi ces derniers la rhéine a été isolée à l'état libre, on l'a caractérisée par son spectre U.V. et son Rf en chromatographie sur papier et sur plaque.

Il existe une petite quantité d'hétérosides anthracéniques acides donnant la même génine après hydrolyse acide .

II - Etude des fruits .

Ces gousses sont parvenues en assez mauvais état, la pulpe était complètement disparue. L'intérieur était attaqué par les parasites.

Sur la partie extérieure du péricarpe facilement détachable et pulvérisable nous avons effectué quelques déterminations ainsi que sur les graines. Nous avons laissé de côté la partie ligneuse du péricarpe et les cloisons séparant les graines.

A - Epicarpe .

Teneur en eau 7,82 %

Cendres totales 8,02 %

L'infusé à 2 % se colore en brun verdâtre par le chlorure ferrique, par ébullition avec l'acide chlorhydrique concentré, on a une coloration rouge et un précipité .

La recherche des dérivés flavoniques par la réaction de la cyanidine est négative. Celle des dérivés anthracéniques par la réaction de BORTRÄGER l'est également.

L'infusé précipite abondamment par le réactif de Stiasny et la gélatine salée. Le filtrat ne se colore pas en bleu par le chlorure ferrique (absence de tanins galliques).

En chromatographie sur papier la teinture au 1/5 concentrée au 1/2 donne une trainée grisâtre après révélation par le chlorure ferrique .

Ces réactions indiquant la présence de tanins catéchiques ceux-ci ont été dosés par précipitation par le réactif de Stiasny.

1 . Tanins catéchiques + catéchines 10,54 de la plante séchée

à 100°

. Catéchines

2,15 %

- Graines .

Teneur en eau 8,45 %

Cendres totales 5,93 %

L'infusé à 2 % se colore en vert clair par le chlorure ferrique, mais ne précipite que faiblement par la réaction de Stiasny.

Il existe donc dans les graines une petite quantité de tanins catéchiques.

Par ailleurs la réaction de la cyanidine est négative.

La recherche des quinones par la réaction de BORNTRÄGER est négative.

La recherche de leucoanthocyane est faiblement positive.

Chapitre VESSAIS SUR DIVERS CASSIA

Quelques essais ont été effectués sur de petits échantillons appartenant à divers Cassia, dont la plupart avaient déjà fait l'objet de recherches chimiques antérieures (Voir travaux antérieurs)

<u>Cassia acutifolia</u> Del.	Feuilles(Lot A.) et (lot B.) Gousses (lot C.)
<u>Cassia auriculata</u> L.	Feuilles Gousses (Péricarpes) Graines
<u>Cassia italica</u> Lam.(= <u>C. obovata</u> Col.)	Feuilles
<u>Cassia occidentalis</u> L.	Feuilles Gousses (Péricarpes) Graines
<u>Cassia sieberiana</u> D.C.	Feuilles Gousses (Péricarpes) Graines
<u>Cassia tora</u> L.	Feuilles

Les techniques précédemment décrites ont été employées. Les dosage de dérivés anthracéniques ont été effectués à partir de l'infusé. (Méthode I. p. 46). Toutes les chromatographies ont été faites dans le butanol-acide acétique-eau (4-1-5 v/v.)(préparation des teintures v.p.52)

I - Cassia acutifolia Del.- Feuilles. (lots A. et B.)

	lot A	lot B
Teneur en eau	8,2	7,9
Cendres totales	12,4	10,3

- Chromatographie sur papier :

	KOH		Bor.Na		Alun K		Acet.Mg.		Fe Cl3-		
Rf	V.	U.V.	V.	U.V.	V.	U.V.	V.	U.V.	V.	U.V.	
0,92	J	j	ro ++	ro ++	ro ++	ro ++	j +	b +	ro ++	ro ++	o
0,88	o	o	o	j +	o	j +	j +	j +	j +	j +	o
0,70	o	bl	o	o	o	o	o	o	o	o	o
0,58	j	or ++	or ++	bo ++	or +	b ++	j +	jb ++	or ++	or ++	b +
0,50	j	b	j	b	o	b	o	jb	o	b +	o
0,42	j	jb ++	j ++	jb ++	j ++	j ++	j +	jb +	j +	j ++	gv +
0,38	j	o	o	o	o	o	o	j	o	b	o
0,30	j	jb +	j +	jb ++	j +	jb ++	j +	jb ++	j +	j ++	gv

b=brun, bl=bleu, bo=brun orangé, gv=gris vert, j=jaune, jb=jaune gris, or=orangé, ro=rose.

La tache bleu de Rf 0,70 n'existe pas dans les feuilles

du lot B.

A noter que la révélation des sennosides n'est bonne

qu'avec l'acétate de magnésium. Les taches de Rf 0,50 et 0,38

correspondent respectivement aux sennosides A et B, et, par addition aux teintures de solutions de sennosides A et B (témoins internes) ces taches deviennent plus intenses.

Récemment, BORKOWSKI et coll. (11) ont utilisé le butanol acétique et la méthode descendante et, parmi 28 réactifs, ont choisi pour les sennosides une solution méthanoliques à 1 % d'acétate de magnésium à laquelle de l'ammoniaque a été ajoutée jusqu'à trouble net. D'autre part KAPADIA et KHORANA (47) utilisent la chromatographie circulaire, le butanol acétique, et, comme révélateur, la soude à 2% dans l'alcool.

La tache de Rf 0,58 plus nette que celles des sennosides correspond peut-être au glucoside primaire de FAIRBAIRN (27), celle de Rf 0,92 à une anthraquinone, celles de Rf 0,42 et 0,30 à des flavones ou à des anthranols.

	lot A	lot B
- Recherche des dérivés anthracéniques:	+	+
Dosage des dérivés anthracéniques:		
Dérivés libres:	0,05 g%	0,20 %
Dérivés acides combinés:	1,5 "	1,7 "
Autres dérivés combinés:	0,14 "	0,21 "
- Recherche des dérivés flavoniques:	o	o
- Recherche des tanins:		tanins catéchiques en petite quantité.
- Recherche des leucoanthocyanes:	o	o

Nous avons comparé les deux lots (lot A du désert: 16° lat N., 30° longit. Est, et lot B de EN NAHUD.) au point de vue chromatographie sur papier et teneur en dérivés anthracéniques. Dans tous les cas les résultats sont très proches.

- Gousses.(lot C.)

Teneur en eau: 8,8 %

Cendres totales: 5,8 %

Chromatographie sur papier: les taches sont les mêmes qu'avec les feuilles à l'exception de celle de Rf 0,88 qui fait défaut.

Recherche des dérivés anthracéniques: +

Dosage des dérivés anthracéniques:

dérivés libres: 0,01 g%

dérivés acides combinés: 1,84

autres dérivés combinés: non dosable.(La liqueur alcaline reste jaune,même après oxydation.)

Recherche des dérivés flavoniques: o

Recherche des tanins: tanins catéchiques en petite quantité.

Recherche des leucoanthocyanes: o

Il y a donc une ressemblance entre les feuilles et les gousses au point de vue chromatographie et teneur en dérivés anthracéniques.

II - Cassia auriculata L.

)- Feuilles.

Teneur en eau: 8 %

Cendres totales: 7,7 %

Chromatographie sur papier :

Rf	KOH		Bor.Na		Alun K		Acet.Mg.		Fe Cl ₃		
	V.	UV.	V.	UV.	V.	UV.	V.	UV.	V.	UV.	
0,90	o	j	b	j	b	j	b	j	b	j	g
0,75	o	j	b	j	b	j	b	j	b	j	g
0,60	o	j	j	j	j	j	j ^b	j	j	j	ve
		+	+	++	+	++	+	++	+	++	+

70	o	o	o	j ₊	o	o	o	o	o	j	o
48	j	g ₊₊	j ₊₊	j ₊₊₊	j ₊₊	j ₊₊₊	j ₊₊	jb ₊₊	j ₊	jb ₊₊	ve ₊₊

j=jaune, jb=jaune brillant, g=gris, ve=vert.

48 = flavone

Recherche des dérivés anthracéniques: o

Recherche des dérivés flavoniques: par la réaction de la cyanidine on obtient une coloration rose.

Recherche des tanins: tanins catéchiques en quantité notable.

Dosage: 7,1 % de tanins condensés.

2,8 % de catéchines.

Recherche des leucoanthocyanes: +(en petite quantité)

Le péricarpe des gousses de Cassia auriculata est donc assez riche en tanins catéchiques. Les écorces de la même espèce renferment également une quantité notable (15 à 20 %) de dérivés.(4)

)- Graines.

Teneur en eau: 8,5 %

Cendres totales: 5 %

- Chromatographie sur papier:

Rf	V.	UV.	KOH V.	UV.	Bor.Na. V.	UV.	Alun K V.	UV.	Acét.Mg V.	UV.	FeCl ₃
0,90	o	j	o	bl	o	o	o	o	o	o	o
0,70	o	j.or	o	j	o	o	j	o	j	o	o
0,45	o	j.or	o	j	o	o	o	o	o	o	o

0,30	:	o	or	:	o	j	:	o	o	:	o	o	:	o	j	:	o
	:			:		+	:			:			:			:	
0,25	:	o	bl	:	o	bl	:	o	o	:	o	bl	:	o	o	:	o
	:			:			:			:			:			:	
0,25	:	j	g	:	j	j	:	j	j	:	o	j	:	o	o	:	o
	:	+	++	:	+	++	:	+	++	:		+	:			:	
	:			:			:			:			:			:	

b=brun, bl=bleu, g=gris, j=jaune, j.or=jaune orangé, or=orangé.

Les taches de Rf 0,70 ; 0,45 ; 0,30; semblent correspondre aux dérivés anthracéniques; 0,25 flavone?

- Recherche des dérivés anthracéniques: +

Dosage des dérivés anthracéniques:

Dérivés libres. 0,06 %

Dérivés combinés non acides: 0,17 %

Dérivés combinés acides: non dosable. (La liqueur alcaline reste jaune même après oxydation.)

- Recherche des dérivés flavoniques: o

- Recherche des tanins. Une petite quantité de tanins catéchiques.

- Recherche des leucoanthocyanes: o

III - Cassia italica (Mill.) Lam. (= C. obovata Col.)

Feuilles .

Teneur en eau : 7 %

Cendres totales : 11,3 %

Chromatographie sur papier :

	KOH		Bor.		Na.		Alun K		Acét.		Mg		Fe Cl ₃	
Rf	V	UV	V	UV	V	UV	V	UV	V	UV	V	UV	V	UV
0,92	j	j	ro	b	ro	b	j	b	ro	or			o	
0,80	j	j	j	j	j	j	jb	+	j	j			o	
0,60	j	j	j	j	j.or	j	j	jb	or	or			o	
0,45	j	g	j	jb	j	j	j	j	j	j			gv	
0,30	j	j	j	j	j	j	j	j	j	j			o	

b=brun, gv=gris vert, j=jaune, jb=jaune brillant,
j.or=jaune orangé, or=orangé, ro=rose.

En chromatographie sur papier, cette espèce donne des taches assez voisines de celles des Sénés officinaux (0,92 : anthraquinone; 0,60 : anthrone? 0,45: flavone) Mais, il ne nous a pas été possible de caractériser les sennosides (pas de taches de Rf 0,38 et 0,50)

Recherche des dérivés anthracéniques: +

Recherché des dérivés flavoniques: +

Recherche des tanins: tanins catéchiques en petite quantité

Recherche des leucoanthocyanes: o

Cette espèce a été officinale en France aux éditions de 1937 et 1949 de la Pharmacopée, mais elle sera supprimée dans la 10^{ème} édition, en raison de sa moindre activité.

Dosage des dérivés anthracéniques :

dérivés libres : 0,03 %

dérivés acides combinés : 1,1 %

autres dérivés combinés : non dosables (la liqueur alcaline reste orangée après l'oxydation)

Ces valeurs sont donc moins élevées que celles obtenues avec les feuilles de C. acutifolia. La réaction de la cyanidine sur l'infusé à 2 % est positive (alors qu'elle est négative pour les folioles de C. acutifolia et C. angustifolia à cette concentration .)

IV - Cassia occidentalis L.

1 - Feuilles

Teneur en eau : 7,3 %

Cendres totales : 12,9 %

Chromatographie sur papier :

Rf : V	UV : V	YOH UV : V	Bor. UV : V	Na UV : V	Alun UV : V	K UV : V	Acét UV :	Mg	Fe	Cl ₃
0,68 o	j j	j j	j j	j j	j b	j	j	j		o
0,35 o	j j	j j	j j	j j	j j	j	j	j		o
0,25 o	j j	j j	j j	j j	j j	j	j	j		o

j=jaune

jb=jaune brillant

Les taches de Rf, 0,68 - 0,35 - 0,25 (faiblement révélées) semblent correspondre aux anthranols ?

- Recherche des dérivés anthracéniques : o
- Recherche : des dérivés flavoniques : o
- Recherche des tanins : tanins catéchiques en petite quantité
- Recherche des leucoanthocyanes : o

L'absence de dérivés anthracéniques confirme les indications de MAURIN (57), de DUQUENOIS (17) . Alors que ABIUSSO (1) a dosé les feuilles de cette espèce, 0,8 à 2,7 % de ces dé-

vés et que PRISTA en a isolé : rhéine, chrysophanol et une substance ayant les caractéristiques d'une 1-8 dihydroxyanthraquinone (59)

S'agirait-il de différentes races chimiques ? ou de variations au cours de la végétation ?

- Gousses (péricarpes)

Teneur en eau : 8,5 %

Cendres totales : 9,7 %

Chromatographie sur papier : une seule tache de Rf 0,40 jaune après les révélateurs précédents, avec le chlorure ferrique aucune coloration (anthranol) .

- Recherches des dérivés anthracéniques : 0

- Recherche des dérivés flavoniques : 0

- Recherche des tanins : tanins catéchiques en petite quantité

- Recherche des leucoanthocyanes : 0

Certains auteurs ont indiqué une teneur en dérivés anthracéniques pour les fruits de cette espèce : 0,25 % (MAURIN -57-) et 3,87 % (ABIUSSO -1-). Récemment DUQUENOIS (17) a détecté de petites quantités de glucosides anthraquinoniques et des traces d'anthranols libres, et a classé cette espèce parmi les Cassia peu purgatifs .

- Graines

Teneur en eau : 9,8 %

Cendres totales : 5 %

Chromatographie sur papier

Rf	KOH		Bor.Na.		Alun K		Acét.Mg		FeCl ₃		
	V.	UV.	V.	UV.	V.	UV.	V.	UV.	V.	UV.	
0,85:	o	j	ro +	g +	ro +	o	o	j	ro +	j	o
0,58:	o	bl	o	o	o	o	o	bl	o	o	o
0,48:	o	fg	o	g	o	o	o	j	o	o	o
0,40:	o	bl	o	o	o	bl	o	bl	o	o	o
0,38:	o	fg +	j ++	j ++	j +	j ++	j +	j ++	j +	j ++	o
0,35:	o	fg	o	g	o	g	j	j	j	j	o
0,28:	o	fg	j	g	o	o	o	j	j	j	o

bl=bleu, g=gris, j=jaune, jg=jaune gris.

(0,85 = anthraquinone, 0,48 - 0,38 - 0,35 - 0,28 =anthranols.)

- Recherche des dérivés anthracéniques: o
- Recherche des dérivés flavoniques: o
- Recherche des tanins: tanins catéchiques en petite quantité.
- Recherche des leucoanthocyanes: o

La réaction de Bornträger a été négative pour nos échantillons, cependant en chromatographie sur papier la tache de Rf 0,85 semble correspondre à un dérivé anthraquinonique libre.

D'ailleurs, de petites quantités de génines ont été isolées des graines de cette espèce par différents auteurs: émodol, (80) (59); chrysophanol, (28) (59); rhéine, (59) et une substance avec les caractéristiques d'une 1 - 8 dihydroxyanthraquinone. (59)

V - Cassia sieberiana D.C.1)- Feuilles .

Teneur en eau: 7,1 %

Cendres totales: 3,8 %

-Chromatographie sur papier:

Rf	V.		UV.		KOH		Bor.Na.		Alun K		Acét.Mg		FeCl ₃
	V.	UV.	V.	UV.	V.	UV.	V.	UV.	V.	UV.	V.	UV.	
0,75:	j	g	j	jg	j	j	j	j	jb	j	jv	ve	
	+	++	++	+++	+	+	+	+	++	+	++	+	
0,65:	j	g	j	jg	j	j	j	j	jb	j	jb	ve	
	+	++	++	+++	+	+	+	+	++	+	++	+	
0,15:	o	bl	o	o	o	o	o	o	bl	o	o	o	

bl=bleu, g=gris, j=jaune, jb=jaune brillant,
jv=jaune vert, ve=vrt.

Les taches de Rf 0,75-0,65: flavones.

- Recherche des dérivés anthracéniques: o
- Recherche des dérivés flavoniques: + Par la réaction de la cyanidine, une coloration orangée.
- Recherche des tanins catéchiques condensés, 4,2 de catéchines.
- Recherche des leucoanthocyanes : o

Cette espèce n'avait jamais fait l'objet d'une recherche chimique. Les feuilles n'ont pas de propriétés purgatives, mais sont employées, par les indigènes d'Afrique, en infusion ou en décoction, comme diurétique et fébrifuge (4) .

2)- Gousses (péricarpes) .

Teneur en eau : 7,4 %

Cendres totales : 5,5 %

Chromatographie sur papier . Par les révélateurs précédents,

une longue trainée brune de Rf 0 à 0,40 et, en lumière ultraviolette, trois taches bleues de Rf 0,20 - 0,30 -

0,45 .

- Recherche des dérivés anthracéniques : o
- Recherche des dérivés flavoniques : o
- Recherche des tanins : tanins catéchiques en petite quantité
- Recherche des leucoanthocyanes : o

Pourtant AUBREVILLE (4) indique la propriété laxative de la pulpe jaune qui enveloppe les graines et qui était complètement desséchée dans l'échantillon examiné .

3)- Graines

Teneur en eau : 8,8 %

Condres totales : 5,5 %

Chromatographie sur papier :

Rf	KOH		Bor.Na:		Alun K.:		Acét.Mg		Fe Cl ₃		
	V.	UV.	V.	UV.	V.	UV.	V.	UV.			
0,85	o	j	o	j	o	o	o	j	o	j	o
0,75	o	j.or	o	jg	o	o	o	j	o	j.or	o
				+						+	
0,50	o	j	o	j	o	j	o	j	o	j	o
										+	
0,40	o	bl	o	o	o	o	o	o	o	o	o
0,32	o	bl	o	o	o	o	o	o	o	o	o
0,25	o	j	o	j	o	j	o	j	o	j	o

bl=bleu, j=jaune, jg=jaune gris, j.or=jaune orangé

Toutes les taches sont révélées faiblement. Les taches de Rf 0,85 - 0,50 - 0,25 semblent correspondre à des anthranols celle de Rf 0,50 à une anthrone .

- Recherche des dérivés anthracéniques : o
- Recherche des dérivés flavoniques : o
- Recherche des tanins : tanins catéchiques en petite quantité
- Recherches des leucoanthocyanes : + (en petite quantité)

VI - Cassia tora L.- Feuilles.

Teneur en eau : 6,8 %

Cendres totales : 11,7 %

Chromatographie sur papier :

Rf	V.	UV.	KOH V.	UV.	Bor.Na V.	UV.	Alun K V.	UV.	Acét. Mg V.	UV.	Fe Cl ₃
0,80:	o	j	j	g	j	j	j	j	j	j	g.ve
			+	++	+	++		+		+	+
0,55:	o	j	j	j	j	j	j	j	j	j	o
0,35:	o	j	o	j	o	o	j	j	o	j	o

j=jaune, jg=jaune gris, g.ve=gris vert

La tache de Rf 0,80:flavone .

- Recherches des dérivés anthracéniques : o . Pourtant DUQUENOIS (17) a détecté des traces d'anthranols dans les feuilles de cette espèce .
- Recherches des dérivés flavoniques : + par la réaction de la cyanidine une coloration orangée, peut-être due à la présence du kampférol 3 diglucoside qui a été isolé des feuilles de cette espèce par FUKUCHI et IMAI(33)
- Recherche des tanins : tanins catéchiques en petite quantité .
- Recherche des leucoanthocyanes : o .

CONCLUSIONS GENERALES

Ce travail est consacré à l'étude de plusieurs Cassia africains dont certains n'avaient encore fait l'objet d'aucune recherche chimique.

Dans la partie botanique, nous avons rappelé brièvement les caractères du genre Cassia et indiqué plus longuement ceux des 8 espèces examinées dans ce travail. Celles -ci ont été comparées au point de vue anatomique.

Dans la partie chimique: Cassia acutifolia , C.arereh, C.auriculata, C.goratensis, C.italica (C.obovata), C.occidentalis, C.sieberiana, C.tora , ont été résumés les travaux antérieurs sur les Cassia. Sur 800 espèces, 31 seulement avaient déjà fait l'objet de travaux, notamment en ce qui concerne leurs dérivés anthracéniques .

1) Nos recherches ont surtout porté sur les feuilles et les fruits du Cassia goratensis qui n'avaient encore jamais été étudiés.

a) les feuilles ne renferment pas de dérivés anthracéniques, mais une quantité importante de tanins catéchiques (environ 10%). D'autre part la poudre des feuilles, traitée par les acides concentrés, prend une coloration rouge violacé intense, se développant plus rapidement à chaud. Cette réaction avait déjà été décrite pour les feuilles de Cassia auriculata sans que la structure de la substance chromogénique ait été élucidée. Nos recherches ont donc eu pour but l'isolement, la purification

puis l'étude de la structure du chromogène.

Dans un premier temps, un produit brut a été séparé de l'extrait éthéré des feuilles; par précipitation au moyen d'éther de pétrole et fractionnement sur colonne de silice, un produit purifié a été obtenu; celui-ci, blanc mais rougissant rapidement à l'air, fond instantanément à 274-275°. D'après les résultats de l'analyse élémentaire a été proposée une formule en $C_{15} H_{14} O_6, 0,5 H_2 O$.

Ses propriétés physiques et chimiques ont permis de la rattacher au groupe des leucoanthocyanes. Le spectre ultraviolet présente en effet 2 maximums à 225 et 280 m μ et il n'y a pas de changement en milieu bicarbonaté, mais un déplacement des maximums à 240 et 290 m μ en présence de carbonate de sodium.

Le spectre infrarouge est en accord avec un dérivé aromatique polyhydroxylé (bande d'absorption à 2,9 μ) mais sans groupement carbonyle (pas de bande à 6,1). La réaction colorée avec les acides concentrés est caractéristique des leucoanthocyanes.

La substance colorée formée passe dans l'alcool amylique et son spectre dans le visible (max. à 565 m μ) et dans l'ultraviolet est en accord avec celui d'une anthocyanadine. D'autre part, le produit est réducteur et présente différentes réactions colorées d'une substance polyphénolique, mais ne présentant pas d'hydroxyles vicinaux. Par hydrolyse acide on n'obtient pas d'oses réducteurs; il ne s'agit donc pas d'un hétéroside.

En chromatographie sur papier bidimensionnelle, le chromogène brut donne 2 taches voisines. Par fusion alcaline, ont été obtenues les substances suivantes (caractérisées en chroma-

tographie sur papier); acide p-hydroxybenzoïque, phloroglucinol.
 et résoncinol
 Le premier phénol est plus abondant dans le produit purifié.

D'autre part un dérivé méthylé a été obtenu ($F = 167^{\circ}$) dont la teneur en méthoxy correspond à un dérivé triméthylé.

La leucoanthocyanidine purifiée serait donc un 5-7-4'-trihydroxyflavane-3-4-diol.

Une évaluation colorimétrique du chromogène dans les feuilles a été tentée, grâce à la réaction colorée avec les acides dont les conditions optimales ont été précisées. Mais le pourcentage trouvé, 6,9 g, est trop élevé car d'autres substances (catéchines) interviennent et fournissent aussi une coloration rouge.

b) En ce qui concerne les gousses, le péricarpe renferme des dérivés anthracéniques: traces d'anthraquinones libres et dérivés combinés réduits, après hydrolyse acide oxydante une gérinine cristallisée a été obtenue et identifiée à l'émодол ou trioxyméthylanthraquinone.

c) Les graines renferment également des dérivés anthracéniques parmi lesquels de l'émодол a été aussi caractérisé. Ces organes ne renferment pas de leucoanthocyane.

2) Chez le Cassia arereh qui n'avait encore fait l'objet d'aucune recherche, une petite quantité de tanins catéchiques, de dérivés flavoniques et de dérivés anthracéniques ont été mis en évidence dans les feuilles; parmi les derniers de la rhéine a pu être caractérisée. Les feuilles ne renferment pas de leucoanthocyane, mais la recherche de ces substances est faiblement positive dans les graines; l'épicarpe des gousses est riche en

tanins catéchiques.

3) Enfin quelques recherches ont été effectuées sur 6 autres espèces de Cassia :

Dans les feuilles et les fruits de Cassia acutifolia, espèce officinale provenant du Soudan, les dérivés anthracéniques ont été dosés (1,6 - 1,9 %) ainsi que dans les feuilles de Cassia italica (= C. obovata), où ils sont moins abondants (1,1 %). Ces substances sont absentes des feuilles et des fruits de Cassia occidentalis, de Cassia sieberiana et des feuilles de Cassia tora.

Les feuilles de Cassia sieberiana sont riches en catéchines (4,2 %) et tanins catéchiques (10,8 %).

Celles de Cassia auriculata renferment un leucoanthocyane, proche de la goratensidine, les fruits contiennent des tanins catéchiques (7,1 %) et des catéchines (2,8 %) en quantité notable, les graines une petite quantité de dérivés anthracéniques (0,23 %).

Au terme de ce travail, malgré certaines lacunes, beaucoup de points laissés obscurs, nous espérons avoir apporté une contribution utile à l'étude biochimique des Cassia africains, notamment en ce qui concerne les dérivés anthracéniques et surtout les leucoanthocyanes présents dans diverses espèces.

BIBLIOGRAPHIE

- 1) ABIUSSO (N). - Estudio químico de Algunas especies Argentinas del genero Cassia. Revista de investigaciones agricolas , 1957,II,3,278 .
- 2) ANCHEL (M.) . Identification of the antibiotic substance from Cassia reticulata as 4,5 dihydroxy-anthraquinone 2 carboxylic acid. J. of. Biol. Chem.,1949,I77, 169-177 .
- 3) ANDREWS (F.W.) - The flowering plants of the Anglo-Egyptian Sudan. Arbroath (Scotland),Buncle , 1954,2,II4 .
- 4) AUBREVILLE (A.) - Flore forestière Soudano-Guinéenne A.O.F. Cameroun-A.E.F. Paris,Larose éd. 1950 217 .
- 5) AUTHERHOFF (H.) - Die Chemische Wertbestimmung der Senna Droge und ihrer galenischen Zubereitungen. Arzneimittel-Forsch. 1951,I,412-414 .
- 6) BAILLON (H.) - Histoire des plantes. Paris, Hachette éd. 1870,II,122 .
- 7) BATE-SMITH(E.C.) - Colour reactions of flowers attributed to (a) flavanols and (b) Carotenoid oxides.J. Of.Exp.Bot. 1953,4,1-9 .
- 8) BATE-SMITH(E.C.) - Leuco-Anthocyanins. I.-Detection and identification of anthocyanidins formed from leuco-anthocyanins in plant tissues. Biochem.J. , 1954,58,122-125 .

- 9) BLATE-SMITH(E.C.) et LERNER(W.H.) - Leuco-Anthocyanins.
2. Systematic distribution of leuco-anthocyanins in leaves.
Biochem.J., 1954, 58, 126-132 .
- 9bis) BLATE-SMITH(E.C.) et SWAIN(T.) - Identification of leuco-anthocyanins as "tannins" in foods. Chem.Ind. 1953, 377-378
- 10) BETTS(T.J.), FAIRBAIRN(J.W.) et MITAL(V.K.) - The paper chromatography of certain anthraquinones and their glycosides.
J.Pharm.Pharmacol. 1958, 10, 436-437 .
- 11) BORKOWSKI(B.), HENNEBERG(M.) et URSULAK(I.) - Chromatographische Untersuchungen über Anthraederivate der Senna. Planta Medica, 1961, 9, 251-261 .
- 12) CANDOLLE(A.P.de) - Prodromus systémati naturalis regni vegetabili. Paris 1824-1873, II; 489.
- 13) CHAKRAVARTI(R.N.), CHAKRAVARTI(D.)? MITRA(M.N.), DASGUPTA(B.) et MALITI(P.C.). Sterols from Indian beans. J.Sci.Ind. Research(India.), 1956, 15C, 86-88. in Chem.Abst. 1956-50, 14838
- 14) CRELLIN(J.K.), FAIRBAIRN(J.W.), FRIEDMANN(C.C.A.) et RYAN(H.A.)
New glycosides from Senna. J. Pharm. Pharmacol. , 1961, 13, 639.
- 15) DEMOLE(E.) - Applications de la microchromatographie d'adsorption sur couches minces. J.Chromatog. , 1958, 1, 24.
- 16) DEMOEL(A.) - Apropos de la recherche colorimétrique du Cassia auriculata. J. Pharm. Belgique, 1960, 15, 60 .
- 16bis) DRAGENDORFF(G) et KUBLY(M.) - Ueber die Bestandtheile der Sennesblätter . Ztsch. f. Chem. 1866, 411-413
- 17) DUQUENOIS(P.) - Observations au sujet de la valeur purgative de quelques espèces non officinales du genre Cassia L

Bul. Acad. nat. Médecine, 1959, 143, 522-525.

- I8) DURAND(M.) - Contribution à l'étude des Aloès, officinaux et en particulier de leur essai physico-chimique.
Thèse Doct. Etat(Pharm.), Paris, 1958 .
- I9) DURAND(M.) et PARIS(R.) - La Casse . Etude de quelques constituants et notamment des dérivés anthracéniques.
Ann.pharm.franc., 1960, I8, 637-642 .
- 20) EL-GAWLI(Rouchdi.S.G.) - Contribution à la normalisation des Sénéés. Thèse Doct. Univ.(Pharm.), Strasbourg, 1948 .
- 2I) ENGLER(A.) et PRANTL(K.) - Die Natürlichen Pflanzen Familien. Leipzig 1894, III, 3, 157 .
- 22) FAIRBAIN(J.W.) - Anthraquinone Derivatives in Drugs.
Pharm.J., 1942, I48, 198 .
- 23) FAIRBAIN(J;W.) , FRIEDLMANN(C.A.), et RYAN(H.A.) - A new active glycoside of Senna. J.Pharm. Pharmacol. , 1958, 10 186 T - 191 T .
- 24) FAIRBAIN(J.W.) et MAHRAN(G.E.D.H.) - Vegetable purgatives containing anthracene derivatives VII . The evaluation of Cascara sagrada and its preparations. J.Pharm. Pharmacol. , 1953, 5, 827-835 .
- 25) FAIRBAIN(J.W.) et MICHAELS(I.) - Vegetable purgatives containing anthracene derivatives. The evaluation of Senna pod and its preparations. J.Pharm. Pharmacol. , 1950, 2, 807-812 .
- 26) FAIRBAIN(J.W.) et MITAL(V.K.) - An Aloin-like substance in Rhamnus purghiana D.C. J.Pharm. Pharmacol., 1958, 10, 217 T-221 T .
- 27) FAIRBAIN(J.W.) et SALEH(M.R.I.) - Vegetable purgatives containing anthracene derivatives.V. A third active

- glycoside of Senna. J.Pharm.Pharmacol. 1951, 3, 918-925 .
- 28) FAROOQ(M.O.), AZIZ(M.A.) et AHMED(M.S.) - Seed oils from Cassia fistula, C.occidentalis, and C.tora. (Indian varieties) J.Am. Oil. Chem. Soc., 1956, 33, 21, 23.
- 29) FORSDIKE(J.L.) - Palthe senna as an adulterant of Indian senna leaves. J.Pharm.Pharmacol.; 1949 , I , 34-37 .
- 30) FORSYTH(W.G.C.) - Cacao polyphenolic substances I. Fractionation of the fresh bean. Biochem.J., 1952, 51, 511-516 .
- 31) FORSYTH(W.G.C.) - Cacao polyphenolic substances 3. Separation and estimation on paper chromatograms. Biochem.J., 1955, 60, 108-111 ,
- 32) FRESSENIUS(D.C.) - Beiträge zur Flora von Abyssinien. 1839, XXII, 53 .
- 33) FUKUCHI(G.) et IMAI(K.) - J.Pharm.Soc.Japan. 1950, 70, 568. in Chem. Abst., 1951, 45, 3999 .
- 34) GANGULY(A.K.) SESHADRI(T.R.) et SUBRAMANIAN(P.) - A Study of leucoanthocyanidins of plants I. Isomers of leucoanthocyanidin from Karada bark and Eucalyptus gum Tetrahedron , 1958, 3, 225-229 .
- 35) GANGULY(A.K.) et SESHADRI(T.R.) - A study of leucoanthocyanidins of plantes II.(+) Leucocyanidin from the gum of Butea frondosa. Tetrahedron, 1959, 6, 21-23 .
- 36) GANGULY(A.K.) et SESHADRI(T.P.) - Leucoanthocyanidins of plants III. Leucopelargonidin from Eucalyptus calophylla Kino. J.Chem.Soc.G.B., 1961, 2787-2790 .
- 37) GEISSMANN(A.), JORGENSEN(E.C.) et HARBORNE(J.B.) - The effect of aluminium chloride on absorption spectra of anthocyanins. Chem. Ind., 1953, 1389 .
- 38) GEISSMANN(A.) et JURD(L.) - The anthocyanin of Spirodela

- oligorrhiza. Arch. Biochem. Biophys., 1955, 56, 259-263 ;
- 39) GILG(E.) et HEINEMANN(H.) - Die Beziehungen des Emodins zur Systematik der Gattung Cassia. Festschrift A. Tschirch Leipzig, Tauchnitz .6d. 1926, 52 .
- 40) GRESHOTT(M.) - Mitteilungen aus dem Chemisch-pharmakologischen Laboratorium des Botanischen Gartens zu Buitenzorg: Cassia glauca. Lam. Chem. Ber., 1890, 23, 3537-3540-3550 .
- 41) HARBORNE(J.B.) - The Chromatographie identification of anthocyanin pigments. J. Chromatog., 1958, 1, 473-488 .
- 42) HAUPTMANN(H.) et NAZARIO(L.L.) - Some constituents of the leaves of Cassia alata L. J. Amer. Chem. Soc., 1950, 72-I, 1492-1495 .
- 43) HEGNAUER(R.) - Chemotaxonomische Betrachtungen 9. Die Systematische Bedeutung des Anthrachinon-Merkmales. Planta Medica, 1959, 7, 344-366 .
- 44) HOLTZEM(H.) - Uber Cassia auriculata L., eine Verfälschung von C. angustifolia Vahl. Dtsche. Apotheker-Ztg., 1958, 98, 151-157 .
- 45) HUTCHINSON(J.) et DALZIEL(J.M.) - Flora of west tropical Africa. London (2 ed.) 1954, 1, 450-455 .
- 46) IWAKAWA(K.) - Uber das entzündungserregende Pulver des japanischen Nutzholzes "Tagayasan". Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. 1911, 65, 315-324 .
- 47) KAPADIA(G.J.) et KHORANA(M.L.) - Paper chromatographic separation of sennoside A and sennoside B. J. Chromatog. 1961, 6, 537-539 .
- 48) KIRIM(M.A.) - Pakistan. J. Sc. Res., 1952, 2, 114. in Chem. Abst., 1953, 47, 7474 .

- 49) KARIYONE(T.) et TSUKIDA(K) - Hydroxyanthrones in plants containing hydroxyanthraquinones.1. Separatory detection of chrysophanic acid and distribution of chrysophanic acid anthrone in plants. J.Pharm.Soc.Japan, 1954, 74, 232-234 .
- 50) KARIYONE(T.), TSUKIDA(K.) et SUZUKI(N.) - Hydroxyanthrones in plants containing hydroxyanthraquinones. J.Pharm.Soc. Japan, 1954, 74, 233-237 .
- 51) KARTNIG(T.H.) - Zur Chemischen Bestimmung der Senna-Wirkstoffe Pharm.Zentralhalle, 1959, 98, 495-499 .
- 52) KEPPLER(H.H.) - The isolation from Acacia mollissima of a crystalline leucoanthocyanidin. Chem.Ind., 1956, 380-381 .
- 53) KEPPLER(H.H.) - The isolation and constitution of mollis-acacidin, a new leuco-anthocyanidin from the heartwood of Acacia mollissima Willd. J.Chem.Soc., 1957, 2721-2724 .
- 54) KUSSMAUL(W.) et BECKER(B.) - Die kolorimetrische Bestimmung der Sennaglykoside . Helv.chim; Acta. 1947, 30, 59-63 .
- 55) LEBRETON(P.H.) - Leucoanthocyanes. Bull.Assoc.franc.Chim. Ind.Cuir., 1961, 23, 91 .
- 56) MAURIN(E.)- La richesse des différents Sénés et dérivés anthracéniques. Bull.Sc.pharmacol., 1922, 29, 617-622 .
- 57) MAURIN(E.) - Recherche des dérivés anthracéniques dans le genre Cassia. Bull.Sc.pharmacol., 1927, 34, 10-12 .
- 58) MODI(F.K.) et KHORANA(M.L.) - Ind.J.Pharm., 1952, 14, 61 in Chem.Abst., 1952, 46, 10545 .
- 59) NOGUEIRA PRISTA(L.), CORREIA ALVES(A.) et FATIMA CORREIA DE ARAUJO(M.) - Cassia occidentalis L; Estudo dos seus

compostos anthraquinonicos. Lisboa, Garcia de Orta, 1959,
7,757-772 .

- 60) PARIS(R.) - Composition chimique du tégument seminal et du péricarpe de Marron d'Inde (*Aesculus Hippocastanus* L.)
Ann. pharm. fr., 1951, 9, 124-128 .
- 61) PARIS(R.) - Caractérisation et dosage de divers hétérosi-
 des par chromatographie sur papier. Produits pharmaceutiques,
 1960, 15, 347-351 .
- 62) PARIS(R.) et CHARTIER(J.) - Sur le "naä-niaye" (*Cassia po-
 doparpa* Guill. et Perr.), drogue d'A.O.F. voisine des Sénéés
 officinaux. Ann. pharm. fr., 1948, 6, 30-35;
- 63) PARIS(R.) et CUBUKCU(B.) - Présence de chromogènes leuco-
 anthocyaniques chez le *Cassia auriculata* L. et le *C. gora-
 tensis* Fres., falsification des Sénéés officinaux. à parai-
 tre Ann. pharm. fr., 1962 .
- 64) PARIS(R.) et DAVID-CUNY(Mme M. F.) - A propos du dosage
 des dérivés anthracéniques dans quelques drogues purgati-
 ves. (Bourdaïne, Cascara, Rhubarbe, Séné.) Ann. pharm. fr.
 1955, 13, 488-495.
- 65) PARIS(R.) et DURAND(M.) - Essais de dosage photométrique
 des composants anthraquinoniques de la Bourdaïne.
Ann. pharm. fr., 1959, 17, 593-599 .
- 66) PARIS(R.) et DURAND(M.) - A propos de l'essais des Aloès.
 Dosage photométrique de l'aloïne. Ann. pharm. fr., 1956, 14,
 755-761 .
- 67) PARIS(R.) et MOYSE(Mme H.) - Dosage colorimétrique des
 dérivés anthracéniques. Application à des Rhubarbes culti-

- vées en France. Ann.pharm.fr., 1958,16,561-573 .
- 68) PARIS(R.) et MOYSE(Mme H.) - Les drogues purgatives à dérivés anthracéniques. Essai physico-chimique et biologique. Produits Pharmaceutiques, 1959,14,462-473 .
- 69) PARIS(R.) et STAMBOULI(A.) - Sur quelques flavonosides difficilement hydrolysables.(scoparoside, cyttoside et aphloioside.) C.R.Ac.Sc., 1961,252,1659-1661 .
- 70) PECKOLT(T.) - Uber die Rinde von Fedegosa do mato Virgen und das Vorkommen von Chrysophansäure in derselben. Arch.Pharmazie, 1868,134,37 .
- 71) QUIRIN(M.) - Contribution à l'étude du Rhamnus cathartica L. Thèse Doct.Etat (Pharm.), Paris, 1960 .
- 72) RIBEREAU-GUYON(P.) - Recherche sur les anthocyanes des végétaux. Application au genre Vitis. Thèse Doct.Sc.Phys., Paris, 1959 .
- 73) ROBBINS(W.J.), KAVANAUGH(F.) et THAYER(I.D.) - Bull.Torrey. Bot.Club , 1947,74,287 . in Chem.Abst., 1947,41,6917 .
- 74) ROUX(D.G.) - Some recent advances in the identification of leuco-anthocyanins and the chemistry of condensed tannins. Nature, 1957,180,973-975 .
- 75) ROUX(D.G.) - Flavan 3,4 diols and leuco-anthocyanidins of Guibourtia sp. Nature , 1959,183,890-891 .
- 76) SABER(A.H.), BALBAA(S.I.) et AWAD(A.T.) - The study of Cassia obovata Colladon. Communication Section Pharmacognosie F.I.P. , Copenhagen 1960 .
- 77) SCHRATZ(E.) et VETHACKE(H.J.) - Papierchromatographische Wertbestimmung von Radix Rhei. Planta Medica, 1958,6,44-69.

- 78) SCHROTER(H.J.M.) - Cassia Arilandica, Linné . Am.J.Pharm.
1888,60,231-235 .
- 79) SEELKOPF(C.) et TERAN(E.R.) - Ein südamerikanischer
Verwandter der Sennosblätter . Arch.Pharmazie ,1960,293,
636-645 .
- 80) SHIMOYAMA - Das Vorkommen des Emodins in den Samen von
Cassia occidentalis L. und Cassia obtusifolia L.
Apotheker Ztg., 1896,II,537 .
- 81) STAMBOULI(A.) et PARIS(R.) - Structure de quelques hétéro-
sides difficilement hydrolysables. (scoparoside, cytisoside,
aphlofoside). Ann.pharm.fr. 1961,19,435-441 .
- 82) STRAUB(W.) et GEBHARDT(H.) - Über die wirksamen Inhaltsstoffe
der Folia Sennae. Arch.Exp.Pathol.Pharmakol., 1936,181,
399-407 .
- 83) STOLL(A.), BECKER(B.) et KUSSMAUL(W.) - Die Isolierung der
Anthraglykoside aus Sennadrogen. Helv.Chimica.Acta, 1949,
32,1892-1903 .
- 84) TAKIDO(M.) - Paper chromatography of anthraquinone
pigments Pharm.Bull.Japan., 1956,4,45-48 .
- 85) TAKIDO(M.) - Studies on the constituents of the seeds of
Cassia obtusifolia L.I. The structure of obtusifolin.
Chem.Pharm.Bull., 1958,6,397 .
- 86) TAYEAU(F.) et MASQUELIER(J.) - Etude chimique sur les
pigments de la graine d'Arachide. I. Le chromogène.
Bull.Soc.Chim.fr., 1948,II67-II72 .
- 87) THOMAS(H.) - Handbuch der Praktischen und Wissenschaftlichen
Pharmazie. Berlin, 1931,5-II,II09 .
- 88) TOLEDO(T.A.N.) - Estudo farmacognostico da Cassia alata L.

Anais.Fac.Farm.Odont.Univ.Sao Paulo; 1948/ 49,7,105-113 .

- 89) TOLEDO(T.A.N.) - Determinação colorimétrica dos principios ativos do Sene. Anais.Fac.Farm.Odont.Univ.Sao Paulo, 1948/ 49,7,115-120 .
- 90) TOLEDO(T.A.N.) et GROTTI(A.S.) - Notas farmacologicas sobre a Cassia leptophylla Vog. et outras espécies de Cassia Anais.Fac.Farm.Odont.Univ.Sao Paulo, 1951,9,179-184 .
- 91) TSUKIDA(K.) - Uber Derivate von Oxyanthrachinon und Oxyanthron in Pflanzen. Planta Medica ,1957,5,97-114 .
- 92) TSUKIDA(K.),SUZUKI(N.) et YOKOTA(M.) - Studies on the constituents of Polygonaceous plants. I. Detection of hydroxyanthraquinones and its distribution in plants. J.Pharm.Soc.Japan;1954,74,224 .
- 93) TSUKIDA(K.) et SUZUKI(N.) - Hydro xyanthr¹ones in plants containing hydroxyanthraquinones. VIII. Components of the bark of Rhamnus purshiana D.C. J.Pharm.Soc.Japan,1955,75, 982-985 .
- 94) TUTIN(F.) - The constituents of Senna Leaves. J.Chem.Soc., 1913,103,2006-2023 .
- 95) VALLOSY - Eine neue einfache Reaktion zum Erkennen der Cassia auriculata. Pharm. Monatsh.,1920,1,77 .
- 96) VICKERS(C.) - An interfering glycoside in the chemical assay of Senna. J.Pharm.Pharmacol. 1961,13,509 .
- 97) VIEJO(J.P.) - Identification des drogues et contrôle des médicaments d'origine végétale par chromatographie sur papier Thèse Doct.Univ.(Pharm.), Paris, 1956 .

Vu le Président

de Thèse:

R. PARIS

Vu et approuvé

le Doyen:

G. VALETTE

Vu et permis d'imprimer

le recteur:

J. ROCHE

